

Die Bedeutung von Fermentation, Photosynthese und Pyrophosphat für das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalis

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Angelika Mustroph

geb. am 31.05.1977 in Dessau

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I: Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Bernhard Grimm
 2. Prof. Dr. Rudolf Ehwald
 3. Prof. Dr. Ulrich Wobus

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Überflutung des Bodens führt zu Sauerstoffmangel	13
1.2	Morphologische und anatomische Reaktionen von Pflanzen auf Sauerstoffmangel	16
1.3	Reaktionen des Pflanzenstoffwechsels auf Sauerstoffmangel	17
1.4	Gärungsformen in Pflanzenzellen	18
1.4.1	Lactat-Gärung und cytoplasmatische Acidose	20
1.4.2	Ethanol-Gärung	21
1.4.3	Energiebilanz der Fermentation	22
1.5	Kohlenhydrate als Substrat der Gärung	23
1.6	Photosynthese unter Sauerstoffmangel	24
1.7	Pyrophosphat als alternativer Energiedonor unter Sauerstoffmangel	25
1.8	Die Rolle der Saccharose-Synthase im Stoffwechsel	27
1.9	Formen der Phosphofructokinase	28
1.9.1	Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6Bisphosphatase	29
1.9.2	PPi-abhängige Phosphofructokinase	31
1.9.3	ATP-abhängige Phosphofructokinase	32
1.10	Weitere PPi-nutzende Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel	33
1.11	Reaktionen von Pflanzen auf Wiederbelüftung	34
1.12	Zielstellung	35
2	Materialien und Methoden	37
2.1	Chemikalien und Reagenzien	37
2.2	Pflanzenmaterial und Anzucht	37
2.2.1	Anzucht von Weizen- und Reis-Sämlingen	37
2.2.2	Anzucht von Kartoffel-Pflanzen	37
2.2.3	Stress-Behandlung	38
2.2.4	Wachstumsversuche	40
2.3	Biochemische Versuche	40
2.3.1	Photometrie	40
2.3.2	Enzym-Aktivitäten	41
2.3.2.1	Enzymextraktion	41
2.3.2.2	Messung der Enzym-Aktivitäten	41
2.3.3	Metabolit-Gehalte	43
2.3.3.1	Saure Extraktion mit TCA, Variante 1	43

2.3.3.2	Saure Extraktion mit TCA, Variante 2.....	43
2.3.3.3	Saure Extraktion mit HClO ₄	43
2.3.3.4	Alkalische Extraktion.....	44
2.3.3.5	Extraktion der Stärke.....	44
2.3.3.6	Spektrophotometrische Bestimmung der Metabolit-Gehalte.....	44
2.3.3.7	Luminometrische Bestimmung der Adenylate	45
2.3.3.8	Bestimmung von Fru2,6BP durch IC-MS.....	46
2.3.4	Bestimmung der Pigmentgehalte	46
2.4	Gaswechselraten.....	47
2.4.1	Messung des Gaswechsels mit dem Warburg-Apparat.....	47
2.4.2	Gärungsraten von Wurzeln im geschlossenen System.....	48
2.4.3	Gärungsraten von intakten Pflanzen im offenen System	48
2.4.3.1	Grundlagen der Messtechnik.....	48
2.4.3.2	Durchführung der Messungen.....	49
2.4.4	CO ₂ -Austauschraten zur Bestimmung der Photosynthese-Rate.....	51
2.4.5	Chlorophyll-Fluoreszenzinduktionskinetiken	52
2.5	Statistik.....	53
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	53
2.6.1	Techniken zur Klonierung.....	53
2.6.2	Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe	54
2.6.3	Northern-Blot-Analyse.....	54
2.6.4	Semiquantitative PCR	55
2.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot.....	56
2.6.6	Herstellung des F2,6BP-RNAi-Konstruktes	56
2.6.7	Klonierung der PFKs.....	57
2.6.8	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	57
2.6.9	Transformation von Pflanzen.....	58
2.6.9.1	Stabile Kartoffel-Transformation mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 58	
2.6.9.2	Transiente Transformation von Tabak-Blättern mit Hilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Fermentations-Stoffwechsel von Reis- und Weizen-Pflanzen unter Anoxie.....	59
3.1.1	Gärungsprozesse unter Anoxie in Dunkelheit.....	59

3.1.1.1	Gärung ganzer Pflanzen während einer 20stündigen Anoxie-Phase	59
3.1.1.2	Fermentationsprodukte von Wurzeln und Sprossen während 4stündiger Anoxie	59
3.1.1.3	Aktivität der fermentativen Enzyme ADH und PDC.....	62
3.1.1.4	Kohlenhydrat-Abbau und Ethanol-Akkumulation in Sprossen und Wurzeln	63
3.1.1.5	Energie-Haushalt und Überlebensraten nach Anoxie	65
3.1.2	Gärungs- und Photosynthese-Prozesse unter Anoxie im Licht.....	67
3.1.2.1	Änderung der Fermentationsraten während des Wechsels zwischen Belichtung und Dunkelheit.....	67
3.1.2.2	Fermentation während einer 20stündigen Anoxie-Periode in ganzen Pflanzen	68
3.1.2.3	Gärungsraten in Sprossen und Wurzeln während 4stündiger Anoxie.....	69
3.1.2.4	Aktivität der fermentativen Enzyme ADH und PDC.....	71
3.1.2.5	Kohlenhydrat-Abbau und Ethanol-Akkumulation in Sprossen und Wurzeln	72
3.1.2.6	Energie-Haushalt und Überlebensraten nach Anoxie	73
3.1.2.7	Pigmentgehalte in Blättern nach 24stündiger Anoxie.....	74
3.1.2.8	Photosynthetischer Gaswechsel nach Anoxie	75
3.1.2.9	Chlorophyll-Fluoreszenz nach Anoxie und Wiederbelüftung	75
3.1.2.10	Fluoreszenz-Analyse während der Anoxie und der Einfluss von CO ₂ -Zugabe	77
3.1.3	Weitere Untersuchungen zum Gärungsstoffwechsel	79
3.1.3.1	Acetaldehyd- und Ethanol-Abgabe während einer Wiederbelüftungsphase	79
3.1.3.2	Fermentationsraten unter Hypoxie-Bedingungen	82
3.1.3.3	Etablierung eines Systems zur einfachen Bestimmung der Fermentationsraten von Wurzeln	84
3.2	Hat PPi eine Bedeutung unter Sauerstoffmangel?	87
3.2.1	Auswirkung von PPi-Mangel auf Reaktionen von Kartoffel-Pflanzen unter Hypoxie	87
3.2.1.1	Grundlegende Beschreibung und Phänotyp der UPPaII-2-Pflanzen.....	87
3.2.1.2	Veränderungen im aeroben Wurzel-Primärstoffwechsel durch verminderten PPi-Gehalt	90
3.2.1.3	Primärstoffwechsel transgener UPPa II-2-Pflanzen unter Hypoxie.....	92

3.2.1.4	Wachstum während der Wiederbelüftung.....	95
3.2.2	Auswirkung verringerter PFP-Aktivität auf Reaktionen von Kartoffel-Pflanzen unter Hypoxie.....	96
3.2.2.1	Einfluss verringerter PFP-Aktivität auf Wachstum und Kohlenhydrat-Haushalt unter belüfteten Bedingungen	97
3.2.2.2	Gärungsstoffwechsel von Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität.....	99
3.2.3	Auswirkungen einer Hemmung der PF2K auf die Gärung in Kartoffel-Wurzeln	103
3.2.3.1	Herstellung und Selektion der F2,6BP-RNAi-Pflanzen.....	103
3.2.3.2	Effekte eines veränderten Fru2,6BP-Gehaltes auf Wachstum und Primärstoffwechsel unter belüfteten Bedingungen	104
3.2.3.3	Gärungsstoffwechsel von Kartoffel-Pflanzen mit verringertem Fru2,6BP-Gehalt unter Hypoxie	106
3.3	Charakterisierung der PFK-Familie	108
3.3.1	Suche nach PFK-kodierenden Genen mittels bioinformatischer Ansätze	108
3.3.2	Klonierung der putativen PFK-Gene und Expression in Tabak-Blättern	111
3.3.3	Analyse der gewebespezifischen Expression der PFK-Gene.....	112
4	Diskussion	114
4.1	Gärung als wichtiger Prozess unter Sauerstoffmangel.....	114
4.1.1	Die Höhe der Ethanol-Gärung bestimmt die Überlebensfähigkeit von jungen Pflanzen bei Anoxie in Dunkelheit	114
4.1.2	Sprosse sind verantwortlich für eine hohe Gärungsaktivität toleranter Reis-Pflanzen	115
4.1.3	Grenzen hoher Gärungsraten.....	117
4.1.4	Acetaldehyd als toxisches Zwischen-Produkt der Gärung.....	118
4.2	Belichtung und Photosynthese	121
4.2.1	Belichtung während der Anoxie verringert die Gärungsrate in Sprossen und verbessert das Überleben der Pflanzen.....	121
4.2.2	Reis ist auch im Licht toleranter gegenüber Anoxie als Weizen	122
4.2.3	Inwieweit funktioniert die Photosynthese unter Anoxie?	124
4.3	Die Rolle von PPi in der Glycolyse unter Sauerstoffmangel	129
4.3.1	Ein Mangel an PPi beeinflusst die Saccharose-Spaltung negativ	129
4.3.2	Die Phosphofructokinase scheint auf den PPi-Mangel nicht zu reagieren.....	131

4.3.3	Glycolyse und Wachstum von PPi-defizienten Pflanzen sind nach Hypoxie deutlich gehemmt	132
4.4	Welche Funktion hat die PFP?	135
4.4.1	Kartoffelpflanzen mit verminderter PFP-Aktivität zeigen nur wenige Veränderungen unter aeroben Bedingungen	135
4.4.2	Verändern sich die Reaktionen auf Hypoxie durch Ausschalten der PFP? ...	137
4.4.3	Auswirkungen eines verminderten Fru2,6BP-Gehaltes auf Kartoffel-Pflanzen unter aeroben Bedingungen.....	139
4.4.4	Gärungsverhalten von Wurzeln der F2,6BP-RNAi-Pflanzen	140
4.4.5	Welches ist die bevorzugte Reaktionsrichtung der PFP?	141
4.5	Klonierung der PFK aus <i>Arabidopsis</i>	143
4.5.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> enthält 7 PFK-Gene	143
4.5.2	Bindestellen von ATP und Fru6P.....	147
4.5.3	Intracelluläre Lokalisation der PFKs.....	148
4.5.4	Gewebespezifische Expression und Expression unter Stress-Bedingungen..	149
4.6	Ausblick	153

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung		EC-Nummer
3PGA	3-Phosphoglycerat	
A	Anoxie	
AA	Acetaldehyd	
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	1.1.1.1
ADP	Adenosin-diphosphat	
AEC	Adenylate energy charge	
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	2.7.7.27
AK	Adenylat-Kinase	2.7.4.3
ALD	Aldolase	4.1.2.13
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase	1.2.1.3
AMP	Adenosin-monophosphat	
ANP	anaerobe Polypeptide	
APX	Ascorbat-Peroxidase	1.11.1.11
ATP	Adenosin-triphosphat	
BSA	Rinder-Serum-Albumin	
C	Belüftete Kontrolle	
CaMV	Cauliflower mosaic virus	
CAT	Catalase	1.11.1.6
Chl	Chlorophyll	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DEPS	De-Epoxidations-Status	
DHAP	Dihydroxyaceton-phosphat (=Glyceron-3-phosphat)	
DTT	Dithiothreitol	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
ENO	Enolase	4.2.1.11
EtOH	Ethanol	
ETR	Elektronentransportrate	
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase	3.1.3.11
FK	Fructokinase	2.7.1.4
Fru	Fructose	
Fru1,6BP	Fructose-1,6-bisphosphat	

Fru2,6BP	Fructose-2,6-bisphosphat	
Fru6P	Fructose-6-phosphat	
FW	Frischgewicht	
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1.1.1.49
GABA	γ -amino-Buttersäure	
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat (= Glyceral-3-Phosphat)	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1.2.1.12
GDH	Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase	1.1.1.8
GK	Glucokinase	2.7.1.2
Glc	Glucose	
Glc1,6BP	Glucose-1,6-bisphosphat	
Glc1P	Glucose-1-phosphat	
Glc6P	Glucose-6-phosphat	
GR	Glutathion-Reduktase	1.8.1.7
H	Hypoxie	
HClO ₄	Perchlorsäure	
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	
HexoseP	Hexose-Phosphat	
HK	Hexokinase	2.7.1.1
HPLC	High performance (pressure) liquid chromatography	
HSA	Humanes Serum-Albumin	
IC-MS	Ionenchromatographie-Massenspektrometrie	
INV	Invertase	3.2.1.26
J _{CO₂-growth}	Netto-CO ₂ -Aufnahmerate unter Wachstumsbedingungen	
J _{CO₂-max}	Maximale CO ₂ -Aufnahmerate unter Lichtsättigung	
LDH	Lactat-Dehydrogenase	1.1.1.27
MDH	Malat-Dehydrogenase	1.1.1.37
MW	Molekulargewicht	
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid	
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid	
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat	
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat	
NDH	NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreductase	1.6.5.3
PDC	Pyruvat-Decarboxylase	4.1.1.1

PDH	Pyruvat-Dehydrogenase	1.2.4.1
PEP	Phosphoenolpyruvat	
PEPC	PEP-Carboxykinase	4.1.1.49
PF2K	6-Phosphofructo-2-kinase/ Fru2,6Bisphosphatase	2.7.1.105
PFK	6-Phosphofructokinase	2.7.1.11
PFP	Pyrophosphat-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase	2.7.1.90
PGI	Phosphoglucose-Isomerase	5.3.1.9
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	2.7.2.3
PGM	Phosphoglucomutase	5.4.2.2
PK	Pyruvat-Kinase	2.7.1.40
PPase	Anorganische Pyrophosphatase	3.6.1.1
PPDK	Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase	2.7.9.1
PPFD	Photosynthetisch wirksame Photonen-Flux-Dichte	
PPi	Pyrophosphat	
PQ	Pasteur-Quotient	
q _N	nicht-photochemisches Quenching der Chlorophyll-Fluoreszenz	
q _P	photochemisches Quenching der Chlorophyll-Fluoreszenz	
R _D	Dunkel-Atmungsrate	
SD	Standardabweichung	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	
SE	Standardfehler	
SOD	Superoxid-Dismutase	1.15.1.1
SP	Signalpeptid	
Suc	Saccharose	
TCA	Trichloressigsäure	
TPI	Triphosphat-Isomerase	5.3.1.1
TPP	Thiamin-Pyrophosphat (=Co-Carboxylase)	
tPPase	Tonoplastidäre Protonen-pumpende Pyrophosphatase	3.6.1.1
TrioseP	Triose-Phosphat	
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)	
UDP	Uridin-diphosphat	
UDPGlc	Uridin-diphospho-Glucose	

UDPGlcDH	UDP-Glucose-Dehydrogenase	1.1.1.22
UE	Untereinheit	
UGPase	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	2.7.7.9
UTP	Uridin-triphosphat	
vATPase	Vakuoläre Protonen-pumpende ATPase	3.6.1.3
WT	Wildtyp	
Φ_{\max}	maximale Quantenausbeute der PSII-Photochemie (dunkel-adaptiert)	
Φ_{PSII}	apparente Quantenausbeute der PSII-Photochemie (licht-adaptiert)	
$\Phi_{\text{CO}_2\text{-app}}$	maximale apparente Quantenausbeute	

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Mustroph A, Albrecht G, Hajirezaei M, Grimm B, Biemelt S. 2005. Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Annals of Botany* 96: 717-726

Mustroph A, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Albrecht G, Grimm B. 2005. Organ specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings I: Dark ethanol production is dominated by the shoots. *Eingereicht bei Planta*

Mustroph A, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Poers Y, Grimm B. 2005. Organ specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings II: Light exposure reduces needs for fermentation and extends survival during anaerobiosis. *Eingereicht bei Planta*

Zusammenfassung

Sind Pflanzenzellen einer Sauerstoffmangel-Situation ausgesetzt, wird in erster Linie die mitochondriale Atmung gehemmt. Dies führt zur Akkumulation von NADH sowie zum Defizit an ATP. Tolerante Reis-Pflanzen können, im Gegensatz zu Weizen oder Kartoffeln, längere Perioden des Sauerstoffmangels überstehen. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, einige Aspekte des Primär-Stoffwechsels zu untersuchen, die für das Überleben solcher Stresssituationen verantwortlich sein können, wie die Ethanol-Gärung, die Photosynthese sowie die Nutzung von Pyrophosphat (PPi) als alternativer Energiedonor bei ATP-Mangel.

Die Gärungsaktivität von Reis- und Weizenpflanzen unter Anoxie wurde mit Hilfe eines photoakustischen Lasersystems in Dunkelheit und Belichtung gemessen. Diese Daten wurden durch Messung der Kohlenhydrat-Gehalte und Enzymaktivitäten sowie durch verschiedene photosynthetische Parameter ergänzt. Daneben wurden Experimente mit transgenen Kartoffelpflanzen, deren PPi-Stoffwechsel verändert war, unter Hypoxie durchgeführt.

Die Bildung von Ethanol ermöglicht es den Pflanzen, NAD zu regenerieren, und so die ATP-Erzeugung während der Glycolyse aufrechtzuerhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass tolerante Reis-Pflanzen unter Anoxie in Dunkelheit erheblich größere Mengen an Ethanol bildeten als sensitive Weizen-Pflanzen. Dieser Unterschied war allerdings nur im Spross nachzuweisen und resultierte aus den hohen Aktivitäten der Gärungsenzyme sowie aus den großen Substratmengen in Reis-Blättern. Allerdings konnten auch Reis-Pflanzen nicht länger als 24 h ohne Sauerstoff in Dunkelheit aufgrund des auftretenden Substratmangels überleben.

Wurden Pflanzen bei Anoxie belichtet, verbesserten sich die Überlebensaussichten erheblich. Die Ethanol-Bildung war aber deutlich verringert, so dass neben der Gärung lichtabhängige Energie-liefernde Prozesse vermutet werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Photosynthese unter Anoxie aufgrund von CO₂-Mangel nur vermindert ablief. Eventuell könnte der zyklische Elektronentransport unter diesen Bedingungen zusätzliches ATP produzieren.

In der Vergangenheit wurde vermutet, dass Pflanzen unter Sauerstoffmangel für Phosphorylierungsreaktionen statt ATP auch PPi nutzen könnten. In transgenen Kartoffelpflanzen, die infolge von Überexpression der *E. coli*-Pyrophosphatase weniger PPi

enthielten als die Kontrollpflanzen, wurde unter Hypoxie-Bedingungen nachgewiesen, dass PPi als alternativer Energiedonor bei der Saccharose-Spaltung eine bedeutende Rolle spielt. Dagegen konnte in transgenen Kartoffelpflanzen mit drastisch verminderter Aktivität der PPi-abhängigen Phosphofructokinase keine zusätzliche Beeinträchtigung der Stoffwechsel-Leistungen unter Hypoxie gezeigt werden, obwohl diese Pflanzen im Vergleich zu Kontrollen nahezu auf die Aktivität der ATP-abhängigen Isoformen angewiesen sind.

Im Verlauf der Promotionsarbeit wurden außerdem für die ATP-abhängige Phosphofructokinase im *Arabidopsis*-Genom sieben Sequenzen gefunden, die Grundlage für zukünftige Experimente zu beiden Formen der Phosphofructokinasen sein werden.

Schlagworte: Sauerstoffmangel, Gärung, Pyrophosphat, Phosphofructokinase

Abstract

Oxygen deficiency stress leads to inhibition of mitochondrial respiration in plant cells, resulting in accumulation of NADH and a decrease in the ATP content. Tolerant rice plants can survive oxygen deficiency better than wheat or potato plants. The aim of this PhD-work was to examine, which biochemical processes are responsible for plant tolerance against low oxygen stress. The studies were focused on the analysis of ethanolic fermentation, photosynthesis and the function of pyrophosphate (PPi) as an alternative and compensatory energy source during ATP deficiency.

The rate of ethanolic fermentation in rice and wheat plants during anoxia was measured by using a laser-based photoacoustic system during darkness and illumination. These data were replenished by the measurements of carbohydrate contents and enzyme activities as well as photosynthetic parameters. Additionally, experiments with transgenic potato plants with altered PPi metabolism were performed under hypoxia.

By using ethanolic fermentation, plants can regenerate NAD and maintain ATP formation during glycolysis. It could be shown that tolerant rice plants produced much higher amounts of ethanol during anoxia in darkness compared to sensitive wheat plants. The high fermentation rate mainly occurred in the shoots as a result of high activities of fermentative enzymes as well as high availability of carbohydrates. Nevertheless, rice plants could not survive more than 24 h of anoxia in the dark because the carbohydrates became depleted.

Illumination during anoxic stress extended survival of plants. Ethanolic fermentation rate was reduced during light exposure of plants, indicating that other energy-producing processes can compensate. However, it could be shown that the complete photosynthesis was slowed down during oxygen deficiency due to CO₂ deficiency. It is likely that cyclic electron transport could at least partially contribute to ATP production during these conditions.

In the past, it was speculated that PPi could replace ATP for phosphorylating processes. With transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase and therefore containing less PPi it was demonstrated that PPi is a significant alternative energy donor for sucrose cleavage during hypoxia. However, in transgenic potato plants with a reduction of synthesis and activity of PPi-dependent phosphofructokinase it could not be demonstrated that these plants suffer more from oxygen- and ATP-deficiency than the control plants, although the

transformants were almost completely dependent on the activity of the ATP-dependent isoforms.

Additionally, during this PhD-work seven sequences, coding for the ATP-dependent phosphofructokinase, were found in the *Arabidopsis* genome. These sequences are essential for future experiments to explore the significant functions of ATP- and PPi-dependent forms of phosphofructokinases.

Keywords: fermentation, pyrophosphate, oxygen deficiency, phosphofructokinase

*Wie erfreulich und angenehm ist doch die Welt der
Bücher, vorausgesetzt, man betritt sie nicht belastet
mit den Verpflichtungen eines Studenten oder in der
Erwartung, hier von Langeweile erlöst zu werden,
sondern in der Begeisterung eines wahren
Entdeckungsreisenden.*

David Grayson, „Adventures in Contentment“¹

¹ aus Colin Dexter, „Mord am Oxford-Kanal“, Rowolth Taschenbuch-Verlag GmbH, Reinbek bei Hamburg

1 Einleitung

1.1 Überflutung des Bodens führt zu Sauerstoffmangel

Neben personellen und materiellen Schäden verursachen Überflutungen auch große Verluste in der Landwirtschaft. Kulturpflanzen sind zumeist nicht in der Lage, Staunässe und Überflutungen des Bodens zu überstehen, im Gegensatz zu den an feuchte Standorte angepassten Wildpflanzen. Besonders Kulturen von Raps, Baumwolle und Kartoffeln, aber auch Getreide wie Gerste und Weizen reagieren mit Ernteverlusten auf solche Stressbedingungen (Abb. 1). Reis ist dagegen die einzige Kulturpflanze, die sich gegenüber Überflutungsperioden tolerant verhält.

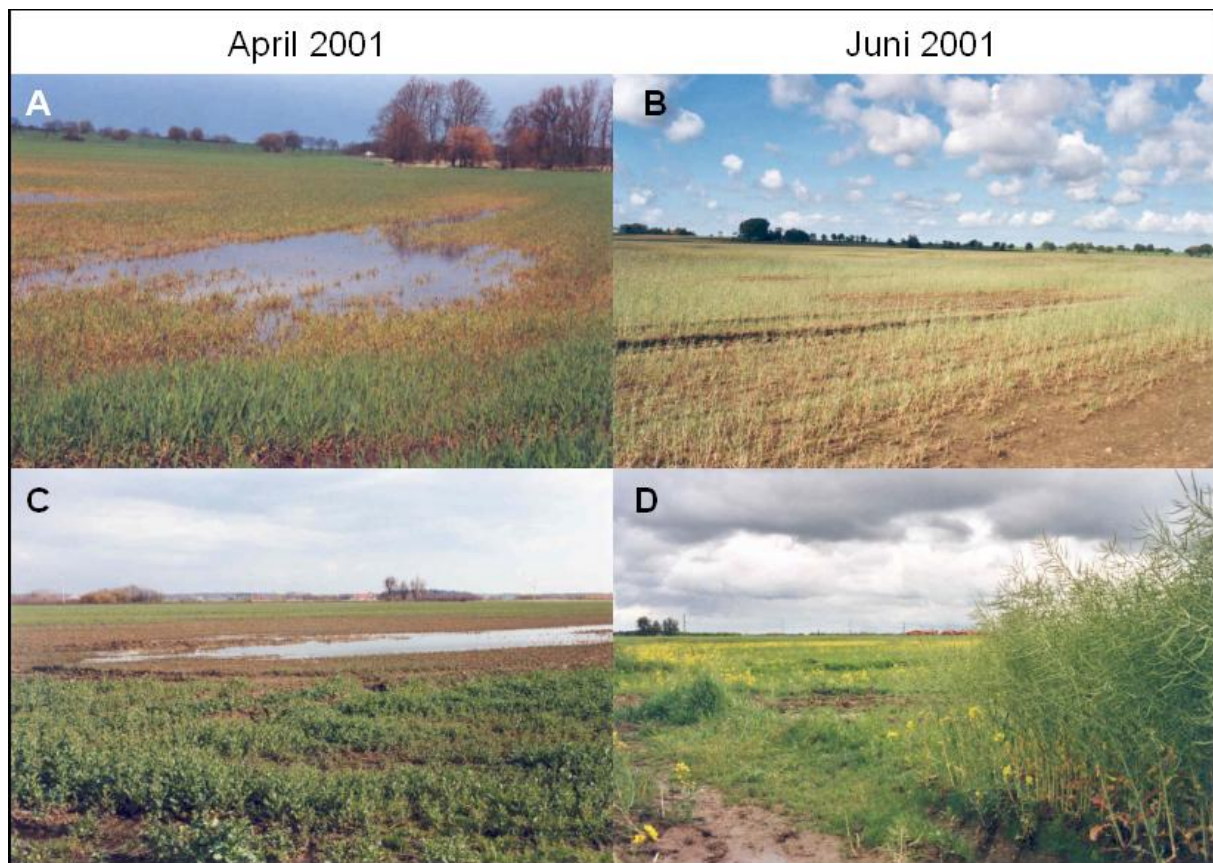


Abb. 1: Überflutung von landwirtschaftlichen Kulturen. Gezeigt sind zwei Felder in Mecklenburg-Vorpommern im Frühjahr 2001. A, B: Gerste-Kultur; C, D: Raps-Kultur; A, C: April 2001; B, D: Juni 2001.

So kommt es in Kulturen von Baumwolle durch Überflutungsschäden durchschnittlich zu Ernteaussfällen von 11 - 40% (Hodgson und Chan 1982). Diese für Australien geltenden Zahlen bewirken für die dortigen Bauern eine Einkommenseinbuße von jährlich 300 Millionen AUSS\$ (Dennis et al. 2000). Die Flut-Katastrophe in Deutschland im Sommer 2002 hat zwar auch in den natürlichen Überflutungsgebieten Schäden in der Vegetation verursacht,

die sich jedoch schnell regenerierten (Abb. 2). In der Landwirtschaft jedoch bewirkten die Überflutungen ernsthaftere Schäden. Allein in Brandenburg kam es zu Ertragsausfällen auf 57.000 ha mit einer Schadenshöhe von ca. 8,5 Millionen € (MLUR 2002a, MLUR 2002b). Bundesweit belief sich der Ernteverlust durch die Überflutung nach einer Schätzung des Deutschen Bauernverbandes allein bei Getreide auf 40 bis 45 Millionen Tonnen, was einem finanziellen Schaden von ca. 1,5 Milliarden € entsprach (MDR 2002). Solche Zahlen belegen die ökonomische Bedeutung dieses Stressfaktors für Kulturpflanzen und somit die Notwendigkeit der Aufklärung der Reaktionen von Pflanzen auf Überflutung.

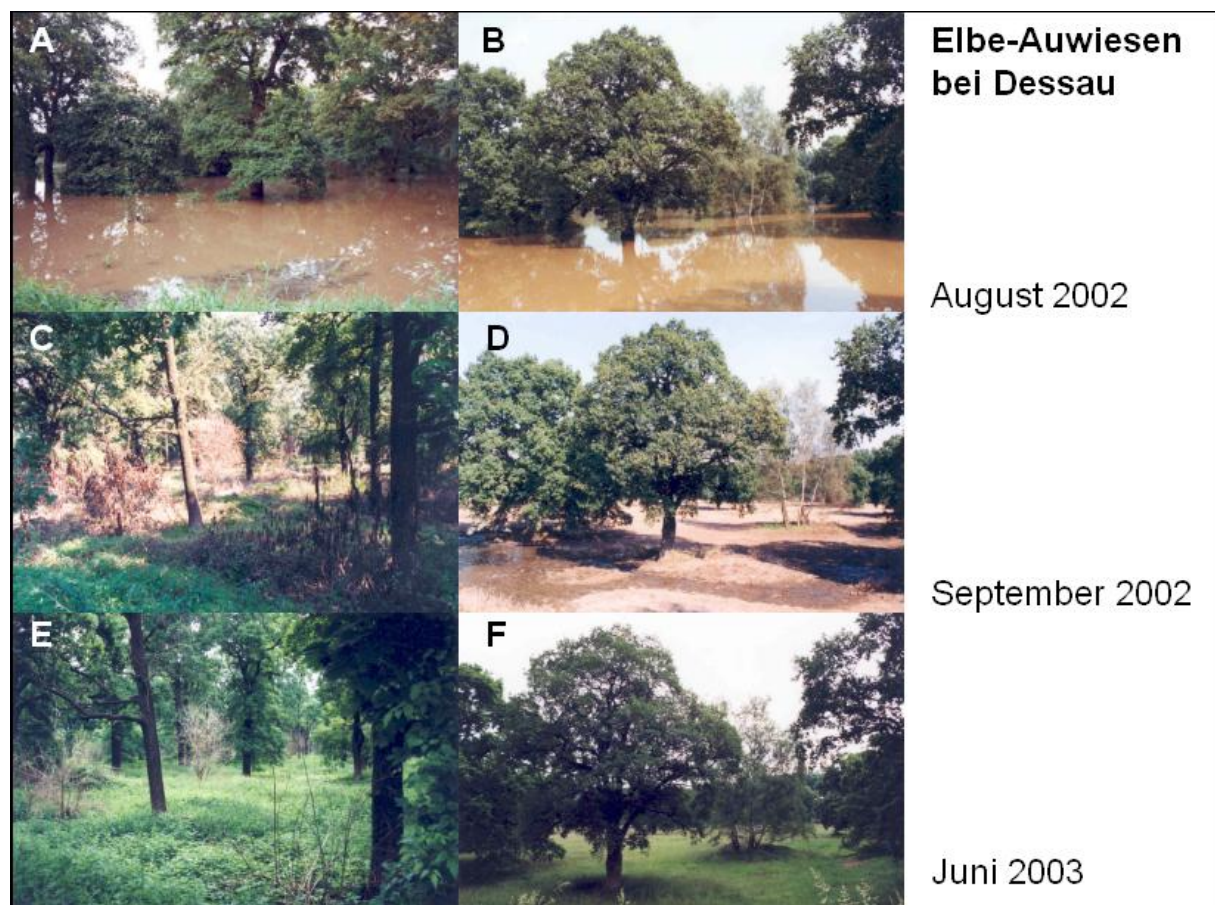


Abb. 2: Überflutung eines naturnahen Ökosystems während des Elbehochwassers im Sommer 2002. Dargestellt sind zwei Bereiche in den Elbwiesen bei Dessau. A, B: August 2002; C, D: September 2002; E, F: Juni 2003.

Überflutung von Böden führt zu Sauerstoffmangel. Dies beruht darauf, dass die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff im Wasser 10^4 -mal geringer ist als in Luft (Armstrong 1979). Atmungsvorgänge von Mikroorganismen und unterirdischen Pflanzenteilen verbrauchen den noch vorhandenen Sauerstoff innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen (Blackwell 1983). Da die heterotrophen Wurzeln zur Energieversorgung auf

die mitochondriale Atmung angewiesen sind, kann ein Mangel an Sauerstoff dramatische Auswirkungen auf den Pflanzen-Stoffwechsel haben, wenn keine Anpassungs-Reaktionen induziert werden können.

Neben dem Fehlen von Sauerstoff treten auf staunassen Böden weitere Probleme für die Pflanze auf. Überflutung des Bodens führt zu einem niedrigen Redox-Potential. Dadurch werden Schwermetalle reduziert, wobei diese löslich und damit toxisch für die Pflanzen werden (Ponnamperuma 1972). Außerdem bilden anaerobe Bakterien toxische Stoffwechselprodukte wie Acetaldehyd, H_2S und Methan (Drew und Lynch 1980).

Der Oberbegriff Sauerstoffmangel kann in die Bezeichnungen Überflutung, Hypoxie und Anoxie (=Anaerobiose) unterteilt werden. Überflutung beschreibt den Zustand, dass Böden, und damit auch die Pflanzen, teilweise mit Wasser bedeckt sind. Jedoch kann der Sauerstoffgehalt des Wassers, insbesondere bei Strömung oder anderen Bewegungen, noch relativ hoch sein (Setter et al. 1987, Ram et al. 1999).

Hypoxie bedeutet, dass die Konzentration von Sauerstoff deutlich geringer als 21% ist, aber noch höher als 0%. Zumeist sind physiologische Reaktionen der Pflanzen erst bei unter 8% Sauerstoff zu beobachten, da die Affinität der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase zu Sauerstoff sehr hoch ist. Nach der Definition von Pradet und Bomsel (1978) bedeutet Hypoxie, dass der Sauerstoff-Partialdruck die mitochondriale Respiration verringert, aber nicht vollständig hemmt, und Wachstums-Einschränkungen auftreten. Demnach werden mit dem Begriff „Hypoxie“ auch Situationen bezeichnet, bei denen geringe Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe (durch Transport oder Photosynthese) trotz sauerstofffreier Umgebung vorhanden sind. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden hypoxische Bedingungen erzeugt, indem die unterirdischen Organe mit Stickstoff begast werden, während die oberirdischen Gewebe noch mit Sauerstoff versorgt sind. Unter diesen Bedingungen können Atmung und Gärung z.T. parallel stattfinden, und Wachstum ist noch nachweisbar.

Anoxie oder Anaerobiose bedeutet, dass der Pflanze kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht. Dies wird experimentell durch kontinuierliche Begasung der gesamten Pflanzenumgebung mit Stickstoff erreicht. Nach Pradet und Bomsel (1978) bezeichnet Anoxie die Situation, in der die mitochondriale ATP-Produktion nahezu vollständig gehemmt

ist. Unter diesen Bedingungen findet Wachstum nur noch in Ausnahmefällen statt, und zwar wurde es lediglich in einigen Geweben von vier *Echinochloa*-Arten, Reis und *Erythrina caffra* beschrieben (Kennedy et al. 1992). Anoxie-Perioden können für längere Zeit nur von wenigen Überdauerungsorganen überlebt werden (z.B. gezeigt für Rhizome von *Iris pseudacorus*, *Phragmites australis*, *Typha latifolia*, *Scirpus maritimus* und *Acorus calamus*, Crawford und Brändle 1996).

1.2 Morphologische und anatomische Reaktionen von Pflanzen auf Sauerstoffmangel

Auf natürlicherweise überfluteten Standorten kommen Pflanzen vor, die sich an eine sauerstoffarme Wurzel-Umgebung angepasst haben. Als Beispiele wären hier folgende Gesellschaften zu nennen: Ufergesellschaften an Flüssen, Seen und Meeren, Wasserpflanzen, Mangroven, sowie Pflanzengesellschaften in Sümpfen und Mooren. Bekannte Wildpflanzen, die gut mit staunassen oder überfluteten Böden umgehen können, sind z.B. Seerosen (*Nymphaea spec.*), Schilf (*Phragmites australis*), verschiedene Seggen- und Binsen-Arten (*Carex spec.*, *Juncus spec.*) sowie einige Bäume (*Alnus glutinosa*, *Salix spec.*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia spec.*).

Eine wichtige Strategie der an überflutete Böden angepassten Pflanzen ist es, Sauerstoffmangel im Gewebe zu vermeiden. Einige Pflanzen sind in der Lage, Luft in unterirdische, überflutete Organe zu befördern. Dazu dienen Aerenchyme, Lentizellen und Atemwurzeln. Aerenchyme sind Gewebe, die ursprünglich aus Intercellular-Räumen entstehen. Sie sind luftgefüllt und haben durch oberirdische Organe, die sich über dem Wasser befinden, Zugang zur Außenluft. Damit kann effektiv sauerstoffreiche Luft in überflutete Gewebe transportiert werden.

In toleranten Pflanzen ist solch ein Gewebe konstitutiv vorhanden, z.B. bei Reis (Clark und Harris 1981, McDonald et al. 2002), Schilf (*Phragmites australis*, Justin und Armstrong 1987, Soukup et al. 2002), *Rumex palustris* (Visser et al. 1996) und *Acorus calamus* (G. Albrecht, unveröffentlicht). In sensitiven Arten wie Weizen und Mais muss solch ein Gewebe erst durch Sauerstoffmangel induziert werden (zusammengefasst bei Colmer 2003). Ausgelöst wird die Aerenchymbildung durch Ethylen (Drew et al. 1981, Jackson und Armstrong 1999, Gunawardena et al. 2001), welches ein wichtiges Hormon bei der Regulation der Pflanzenantwort auf Überflutung ist (Grichko und Glick 2001, Peeters et al. 2002, Cox et al. 2004). Durch ausgedehnte Aerenchyme kann Sauerstoff nicht nur in die überfluteten Wurzeln

transportiert werden, sondern entweicht auch durch sogenannten „radial oxygen loss“ in den Boden. So kann sich die Pflanze eine sauerstoffhaltige Umgebung schaffen, um sich vor der Bildung toxischer Produkte des Stoffwechsels anaerober Bakterien im Boden zu schützen.

Um den Zugang der in Wurzeln und Blättern vorhandenen Aerenchyme zur Luft zu erleichtern, existieren ebenfalls verschiedene Strategien. Bei Bäumen und Sträuchern können im Stamm Lentizellen ausgebildet werden (z.B. *Pinus*, Topa und McLeod 1986), die die Belüftung der inneren Gewebe fördern. Außerdem können Atemwurzeln in verschiedenen Formen existieren (*Rhizophora spec.*, *Avicennia spec.*, *Taxodium spec.*, *Laguncularia spec.*, Geißler et al. 2002). Krautige Pflanzen reagieren auf Überflutung mit einer Elongation der Sprosse, bis die Blätter wieder Kontakt zur Luft haben. Dies wurde z.B. für *Rumex palustris* (Voesenek und Blom 1989) und Reis (Vergara et al. 1976) beobachtet. Diese Reaktionen werden ebenfalls durch Ethylen vermittelt (zusammengefasst in Peeters et al. 2002, Vriezen et al. 2003).

1.3 Reaktionen des Pflanzenstoffwechsels auf Sauerstoffmangel

Erfolgen Reaktionen zur Vermeidung des zellinternen Sauerstoffmangels zu langsam, oder ist kein Zugang zu sauerstoffhaltiger Luft möglich, reagiert die Pflanze mit Veränderungen des Stoffwechsels. Reis-Keimlinge, die ein oben beschriebenes Durchlüftungssystem besitzen, zeigen bei Hypoxie-Bedingungen kaum Sauerstoffmangel-bedingte Reaktionen des Stoffwechsels, im Gegensatz zu Weizen oder Mais, denen ein ausgedehntes Aerenchym fehlt (Mustroph und Albrecht 2003).

Reaktionen des Pflanzenstoffwechsels auf ein Sauerstoff-Defizit sind in der Vergangenheit schon ausführlich untersucht worden. Zusammenfassungen über diese Reaktionen geben verschiedene Übersichtsartikel (Kennedy et al. 1992, Perata und Alpi 1993, Ricard et al. 1994, Crawford und Brändle 1996, Vartapetian und Jackson 1997, Drew 1997, Dennis et al. 2000, Liao und Lin 2001, Sousa und Sodek 2002, Geigenberger 2003, Gibbs und Greenway 2003, Greenway und Gibbs 2003). Weitere Arbeiten fassen speziell die Anpassungsreaktionen von Reis unter Sauerstoffmangel zusammen (Das und Uchimiya 2002, Ram et al. 2002, Jackson und Ram 2003).

Allgemein treten folgende Stoffwechselveränderungen unter Sauerstoffmangel auf:

- i. Hemmung der mitochondrialen Atmung und Induktion von Gärungsprozessen
- ii. Erhöhung der Glycolyse-Rate durch Induktion der glycolytischen Enzyme
- iii. Hemmung der Photosynthese durch Schädigung der Wurzeln
- iv. Bevorzugung von PPi-nutzenden gegenüber ATP-nutzenden Enzymen

1.4 Gärungsformen in Pflanzenzellen

Sobald eine Pflanzenzelle einem Mangel an Sauerstoff ausgesetzt wird, kommt es zur Hemmung der mitochondrialen Atmung, da Sauerstoff als End-Elektronen-Akzeptor fehlt. In der Folge häufen sich Reduktionsäquivalente in Form von NADH aus Glycolyse und TCA-Zyklus an, und die Neusynthese von ATP ist drastisch vermindert. Um die ATP-Produktion wenigstens während der Glycolyse aufrechtzuerhalten und deren Ablauf zu gewährleisten, muss das NAD in der Zelle regeneriert werden. Dazu werden Gärungsprozesse in Gang gesetzt. In Pflanzen sind zwei Gärungsformen bekannt, die Lactat-Gärung sowie die Ethanol-Gärung. Ersterer Weg benutzt die Lactat-Dehydrogenase (LDH), um aus Pyruvat Lactat herzustellen. Der zweite Prozess synthetisiert aus Pyruvat zunächst Acetaldehyd mit Hilfe der Pyruvat-Decarboxylase (PDC), und danach Ethanol mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) (Abb. 3). Dabei ist die PDC der geschwindigkeitsbestimmende Reaktions-Schritt.

Gärungsenzyme werden in allen Pflanzen-Geweben unter Sauerstoffmangel induziert, z.B. in Reis (Bertani et al. 1980, Rivoal et al. 1997), Gerste (Good und Crosby 1989), Weizen (Bertani und Brambilla 1982b, Waters et al. 1991, Albrecht et al. 2004), Mais (Wignarajah und Greenway 1976, Andrews et al. 1994, Christopher und Good 1996) und Kartoffel (Biemelt et al. 1999). Sie gehören zu den „anaeroben Polypeptiden“ (ANPs, Sachs et al. 1996). Zu dieser Kategorie zählen außerdem verschiedene glycolytische Enzyme sowie Enzyme der Saccharose-Spaltung, die ebenfalls unter Sauerstoffmangel induziert werden (Abb. 4, Sachs et al. 1996, Dennis et al. 2000).

Neben den beiden beschriebenen Gärungsformen sind noch alternative NADH-verbrauchende Stoffwechselwege in der Diskussion (zusammengefasst in Crawford 1992, Sousa und Sodek 2002, Reggiani und Bertani 2003). Dazu gehören die Bildung von Malat, Alanin, Aspartat, Succinat, GABA oder Shikimat (Abb. 3). Allerdings wurden diese Substanzen nur in einigen

untersuchten Pflanzen nach Sauerstoffmangel gefunden, und sie akkumulierten häufig nur in den ersten Stunden nach Einsetzen der Anoxie (Roberts et al. 1992, Good und Münch 1993), so dass ihnen für die Energiebereitstellung während längerer Anoxie-Perioden keine Bedeutung beigemessen wird. Die Synthese solcher alternativen Endprodukte kann allerdings andere wichtige Funktionen haben. So wirken einige Stoffe einer cytoplasmatischen Acidose, die bei geringem Sauerstoffgehalt auftreten kann, entgegen. Für überflutungstolerante Reis-Pflanzen wurde beobachtet, dass als Kompensation der Ansäuerung Substanzen wie Alanin, GABA und Succinat gebildet werden, wohingegen der weniger tolerante Weizen die Ansäuerung nicht verhindern kann (Menegus et al. 1989, Menegus et al. 1991, Reggiani et al. 2000). Weiterhin werden diese Metabolite in der Vakuole gespeichert, und vermindern so den Kohlenhydrat-Verlust, der durch Ausscheidung von Ethanol oder Lactat auftritt. Bei Wiederbelüftung können sie dann zur aeroben Energiegewinnung genutzt werden.

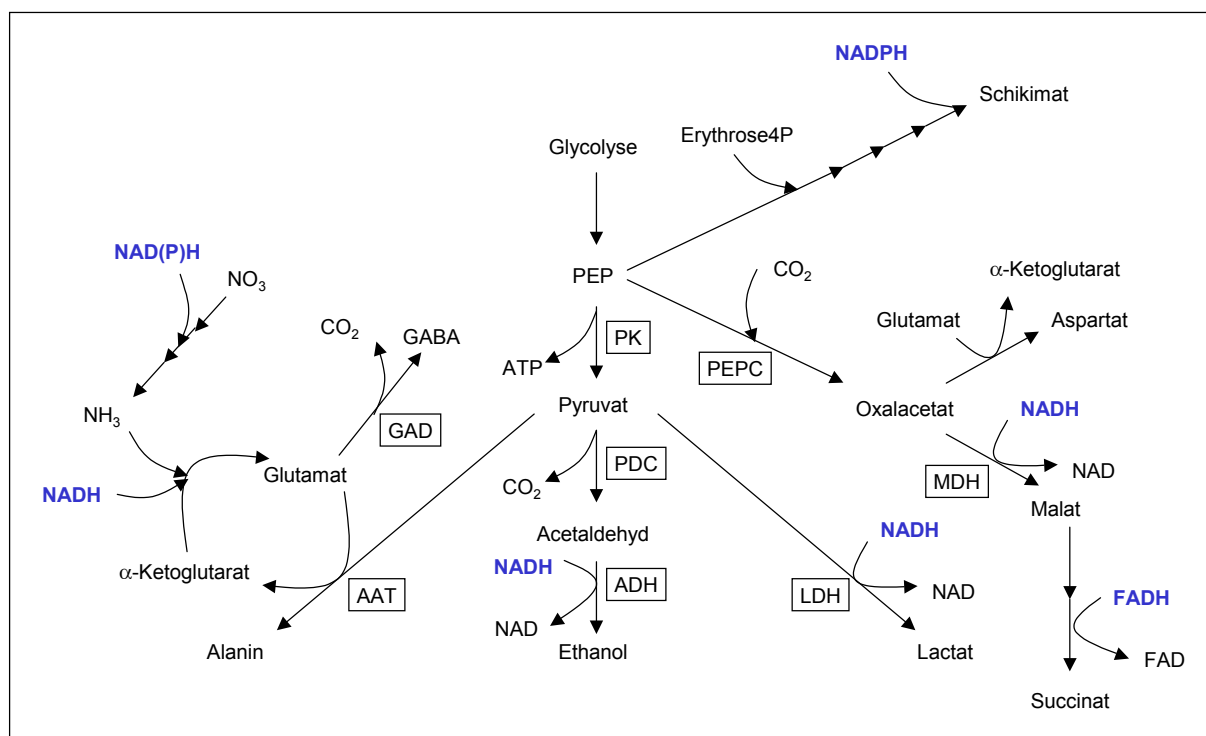


Abb. 3: Schema der Haupt-Gärungsformen sowie einiger alternativer NADH-konsumierender Prozesse in Pflanzenzellen. Abkürzungen: AAT, Alanin-Amino-Transferase; ADH, Alkohol-Dehydrogenase; GAD, Glutamat-Decarboxylase; GABA, γ -Amino-Buttersäure; MDH, Malat-Dehydrogenase; PDC, Pyruvat-Decarboxylase; PEP, Phosphoenol-Pyruvat; PEPC, PEP-Carboxykinase; PK, Pyruvat-Kinase.

Gärung verhindert es, dass der glycolytische Prozess unter Sauerstoffmangel zum Stillstand kommt. Dabei treten aber mehrere für die Pflanze ungünstige Faktoren auf, die im Folgenden aufgelistet sind:

- i. Die Bildung von Lactat verursacht eine Ansäuerung des Cytosols.

- ii. Acetaldehyd und Ethanol sind zelltoxische Substanzen.
- iii. Die Energieausbeute der Glycolyse ist sehr gering im Vergleich zur mitochondrialen Atmung.

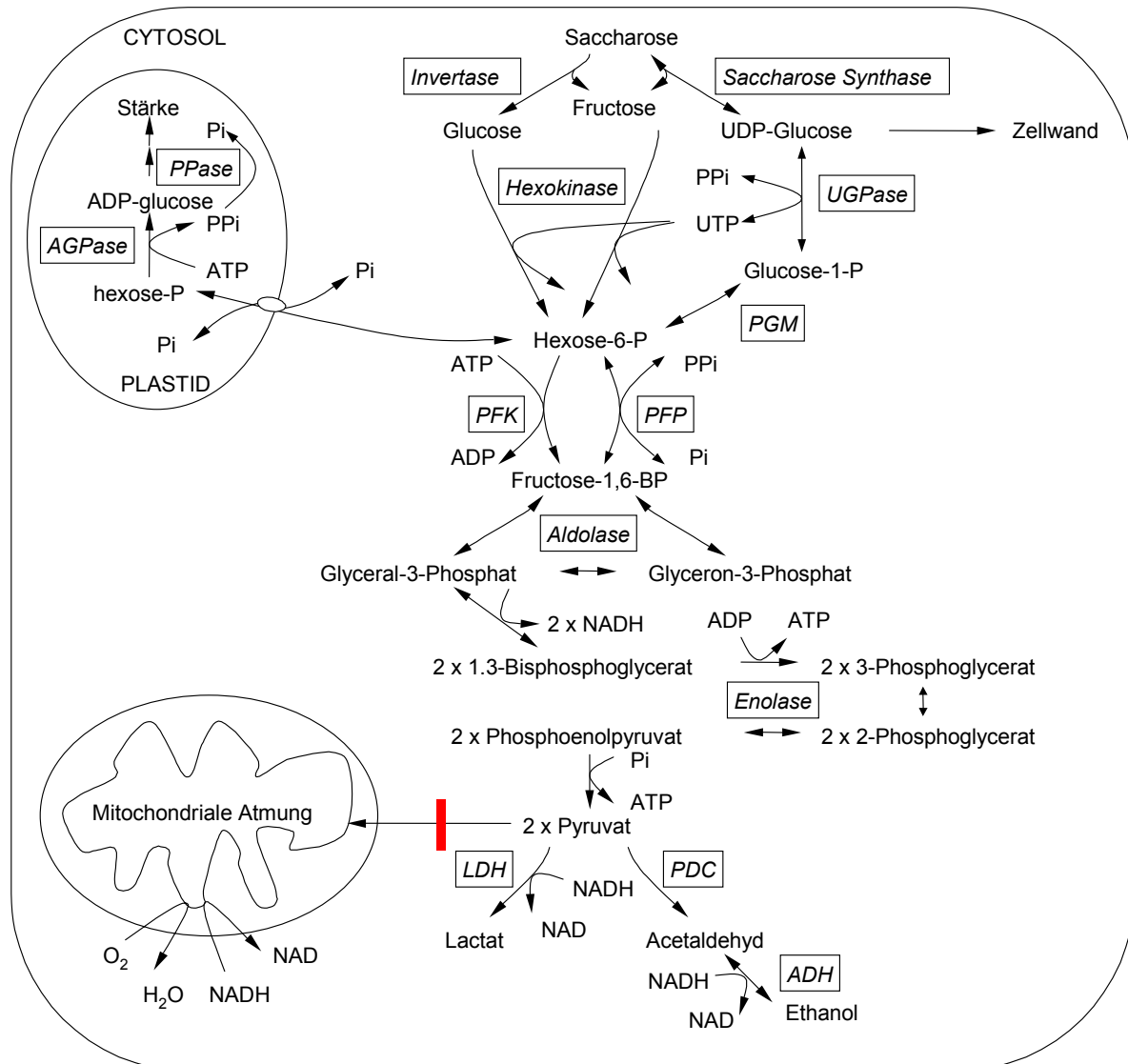


Abb. 4: Schema der primären Stoffwechselvorgänge in Wurzel-Zellen. Dargestellt sind Saccharose-Spaltung, Glycolyse, mitochondriale Atmung, Fermentation und Stärkesynthese. Abkürzungen: ADH, Alkohol-Dehydrogenase; AGPase, ADPGlc-Pyrophosphorylase; LDH, Lactat-Dehydrogenase; PDC, Pyruvat-Decarboxylase, PFK, Phosphofructokinase; PFP, Pyrophosphat-Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase; PGM, Phosphoglucomutase; UGPase, UDPGlc-Pyrophosphorylase.

1.4.1 Lactat-Gärung und cytoplasmatische Acidose

Die Lactat-Gärung wird am Anfang einer Sauerstoffmangel-Periode induziert (Christopher und Good 1996). Da Lactat als Säure wirkt, fällt kurz nach Einsetzen der Lactat-Gärung der cytoplasmatische pH-Wert ab. Diese Ansäuerung wird als cytoplasmatische Acidose

bezeichnet (Davies 1980, Roberts et al. 1984a, Roberts et al. 1984b, Roberts et al. 1985). Nach der Davies-Roberts-pH-Stat-Hypothese ist diese Acidose eine wesentliche Ursache für das Absterben der Pflanzen unter Sauerstoffmangel. Durch Ansäuerung des Cytoplasmas wird die LDH sehr schnell inaktiviert, und die PDC wird aktiviert (Davies et al. 1974). Lactat kann von Wurzeln ausgeschieden werden, um so eine cytoplasmatische Ansäuerung zu vermeiden (Xia und Saglio 1992, Xia und Roberts 1994, Rivoal und Hanson 1994). Trotzdem wird der Höhepunkt der Lactat-Bildung schon nach wenigen Stunden Anoxie überschritten (Xia und Saglio 1992, Horlacher und Poskuta 1986). Für längere Anoxie-Perioden wird deshalb vermutet, dass Ethanol-Gärung in Verbindung mit der Glycolyse die wichtigste Quelle anaerober ATP-Produktion ist (Good und Münch 1993, Rivoal und Hanson 1993).

1.4.2 Ethanol-Gärung

Das Problem der Ethanol-Gärung ist, dass beide Reaktionsprodukte toxisch wirken. Diese Beobachtung führte in der Vergangenheit zu der Annahme, dass eine hohe Ethanol-Gärungsrate ein Merkmal sensibler Pflanzen sei. Grundlage dieser Hypothese war der Befund, dass überflutungstolerante Pflanzenarten unter hypoxischen Bedingungen eine geringere Aktivität der Gärungsenzyme aufweisen als sensitive Arten (McManmon und Crawford 1971). Nach der Crawford-Theorie sollen demnach tolerante Arten die Produktion des toxischen Ethanols verhindern, und alternative Gärungsprodukte wie Malat, Alanin, GABA, Succinat oder Aspartat bilden. Diese Theorie ist heute nicht mehr aktuell, da verschiedene Gegenargumente aufgezeigt werden konnten (Kennedy et al. 1992, Mustroph und Albrecht 2003).

Zum einen werden Acetaldehyd und Ethanol sehr schnell von der Pflanze ausgeschieden. Bis zu 98% des gebildeten Ethanols werden von Wurzeln abgegeben (Bertani et al. 1980), und auch Sprosse scheiden viel Ethanol aus (Boamfa et al. 2003). Somit kommt es häufig gar nicht zur Anreicherung von Ethanol im Gewebe. Außerdem sind von Pflanzen tolerierte Ethanol-Konzentrationen im Allgemeinen sehr hoch (Jackson et al. 1982). Zum zweiten konnte bisher nicht nachgewiesen werden, daß Pflanzen hohe Mengen an alternativen Gärungs-Endprodukten bilden (Avadhani et al. 1978, Bertani und Brambilla 1982a, Thomson et al. 1989). Zum dritten konnte bei einem Vergleich von tolerantem Reis und sensitivem Weizen (Mustroph und Albrecht 2003) sowie bei einem Vergleich verschiedener Wildpflanzen (Albrecht, unveröffentlicht) unter Hypoxie-Bedingungen zwar eine Korrelation zwischen Toleranz und geringer PDC-Induktion beobachtet werden, dies beruhte aber auf

anderen Ursachen: Während tolerante Arten ein Aerenchym ausbilden und somit Sauerstoffmangel vermeiden, sind empfindliche Pflanzen von Hypoxie betroffen, und müssen die PDC induzieren. Verlässliche Aussagen über einen Vergleich von Gärungsraten in unterschiedlich toleranten Pflanzen kann man demzufolge nur tätigen, wenn Sauerstofftransport und andere Sauerstoff-erzeugende Prozesse wie Photosynthese generell ausgeschlossen sind. Dies ist nur bei Anoxie in Dunkelheit möglich.

1.4.3 Energiebilanz der Fermentation

Ein weiteres Problem der Gärung ist, dass bei diesem Prozess zwar NAD regeneriert werden kann, aber kein ATP gebildet wird. Sowohl Lactat als auch Ethanol sind noch energiehaltige Endprodukte, im Gegensatz zum CO₂ als Endprodukt der mitochondrialen Atmung. So erhält die Pflanze pro Molekül Glucose, das in der Glycolyse abgebaut wird, nur 2 Moleküle ATP, die während des glycolytischen Prozesses gebildet werden, im Vergleich zu bis zu 36 Molekülen ATP während der aeroben Respiration. Dies führt unter Sauerstoffmangel zu einem dramatischen Mangel an ATP, der andere Stoffwechselvorgänge sowie das Wachstum hemmt. Pflanzen haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um darauf zu reagieren.

Einmal existiert die Möglichkeit, die Rate der Glycolyse zu erhöhen, um dadurch mehr ATP produzieren zu können. Dieser Vorgang wird auch als Pasteur-Effekt bezeichnet (Summers et al. 2000). Einige Autoren konnten zeigen, dass Reis-Varietäten mit der höchsten Gärungsrate auch die höchste Toleranz gegenüber Anoxie haben (Setter et al. 1994, Gibbs et al. 2000). Für einige Pflanzen konnte außerdem ein deutlicher Pasteur-Effekt nachgewiesen werden, z.B. für *Potamogeton pectinatus* (Summers et al. 2000) und Reis (Mayne und Kende 1986). Allerdings zeigten Pflanzen, die ADH oder PDC überexprimierten, und somit mehr gären konnten, keine erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel (Tadege et al. 1998, Ellis et al. 2000, Rahman et al. 2001). Sie waren sogar empfindlicher als Wildtypen.

Diese Beobachtungen beruhen darauf, dass die Glycolyse immer auch ein Kohlenhydrat-verbrauchender Prozess ist. Demzufolge würde sich eine hohe Gärungsrate negativ auf den Zuckervorrat und damit auf das langfristige Überleben der Pflanzen auswirken. Organe, die häufig längeren Perioden von Anoxie ausgesetzt sind, reagieren daher mit unveränderten oder verminderten Glycolyse-Raten, um diese Phase zu überdauern, so z.B. Rhizome von *Acorus calamus* und *Iris pseudacorus* (Bucher et al. 1996, Schlüter und Crawford 2001), Rhizome von *Scirpus maritimus* und *Phalaris arundinacea* (Barclay und Crawford 1983) sowie Samen

von Salat (Pradet und Bomsel 1978). Einige Arten können auf diese Weise mehrere Monate der Anoxie überdauern (Crawford und Brändle 1996). Auch sensitive Organe wie Kartoffel-Knollen oder Weizen-Wurzeln reagieren auf Sauerstoffmangel mit einer verminderten Glycolyse-Rate (Geigenberger et al. 2000, Albrecht et al. 2004).

Die Schwierigkeiten, bisher veröffentlichte Ergebnisse zu vergleichen, beruhen darauf, dass verschiedene Autoren unterschiedliche Organe, Pflanzenarten und Stressbedingungen untersucht haben. Eine endgültige Aussage über die Bedeutung der Gärung kann demnach nicht getroffen werden.

1.5 Kohlenhydrate als Substrat der Gärung

Wie oben beschrieben, sind Kohlenhydrate als Substrat für die Gärung unter Sauerstoffmangel von großer Wichtigkeit. Es wurden allerdings in der Vergangenheit sich widersprechende Ergebnisse publiziert (Kohlenhydrat-Akkumulation oder Kohlenhydrat-Abbau unter Sauerstoffmangel), die durch unterschiedliche Stress-Behandlungsmethoden hervorgerufen werden. Wird genau zwischen Hypoxie und Anoxie unterschieden, sind eindeutigere Aussagen zu treffen.

Unter Hypoxie-Bedingungen, d.h. wenn Sauerstoff zumindest in einigen Pflanzenorganen noch verfügbar ist, akkumulieren Kohlenhydrate in bisher untersuchten Pflanzen, z.B. Weizen (Waters et al. 1991, Albrecht et al. 1993, Mustroph und Albrecht 2003, Albrecht et al. 2004), Mais (Atwell et al. 1985), Kartoffel (Zhou und Solomos 1998, Biemelt et al. 1999) oder anderen Pflanzen (Setter et al. 1987, Albrecht et al. 1997, Albrecht und Biemelt 1998). Dabei werden nicht nur Hexosen und Saccharose akkumuliert, sondern je nach bevorzugter Speicherform auch Stärke oder Fructane (Albrecht et al. 1993, Albrecht und Biemelt 1998). Diese Akkumulation wird damit erklärt, dass die Glycolyse-Rate in den hypoxischen Wurzeln nicht erhöht ist (Albrecht und Wiedenroth 1994), das Wachstum aber vermindert und die Photosynthese nicht deutlich beeinträchtigt (Mustroph und Albrecht 2003).

Unter Anoxie, d.h. wenn kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht, und demnach die Glycolyse der einzige Energie-liefernde Weg ist, wird dagegen eine Verringerung der Mengen an löslichen Zuckern beobachtet (Bertani et al. 1981, Guglielminetti et al. 1995, Perata et al. 1996, Mustroph und Albrecht 2003, Albrecht et al. 2004). Unter diesen Bedingungen findet wahrscheinlich keine Kohlenhydrat-Synthese durch Photosynthese mehr

statt. Außerdem ist der Transport von Kohlenhydraten vom Spross in die Wurzeln durch geringen Sauerstoffgehalt und dem daraus folgenden Energiemangel gehemmt (Saglio 1985, Zimmermann et al. 1995, Dongen et al. 2003).

Auch die Synthese von Amylase zum Abbau von Stärke in den Samen der meisten Pflanzen ist durch Mangel an Sauerstoff vermindert, und führt so zu einer Knappheit der für die Fermentation nutzbaren Zucker. Dies führt in den meisten Samen zur Keimungshemmung bei Anoxie. Dennoch gibt es Pflanzen, die unter diesen Bedingungen Stärke abbauen und für die Gärung nutzen können. Im Gegensatz zu Karyopsen von Weizen, Gerste und Hafer sind Reis-Samen in der Lage, eine anaerobe Amylase zu bilden, und somit ohne Sauerstoff zu keimen (Perata und Alpi 1993, Guglielminetti et al. 1995, Hwang et al. 1999).

1.6 Photosynthese unter Sauerstoffmangel

Die Kohlenhydrat-Limitierung der Gärung sowie verschiedene weitere Beobachtungen führten zu der Idee, die Bedeutung lichtabhängiger Prozesse, in erster Linie der Photosynthese, für den Stoffwechsel unter Sauerstoffmangel zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Belichtung während einer Anoxie-Periode das Überleben von Pflanzen deutlich verbesserte (Nabben et al. 1999, Mustroph und Albrecht 2003). Außerdem besagen Untersuchungen, dass klares Überflutungswasser im Gegensatz zu trübem Wasser das Überleben von Reis-Pflanzen positiv beeinflusst (Ram et al. 2002). Die Ergebnisse deuten an, dass die Photosynthese als Kohlenhydrat- und Sauerstoff-Produzent den Energie-Stoffwechsel unter Anoxie verbessert.

Detaillierte Untersuchungen zur Photosynthese unter Anoxie sind bisher nicht publiziert worden. Verschiedene Studien (Harris und Heber 1993, Haldimann und Strasser 1999, Farineau 1999, Ivanov und Edwards 2000, Garstka et al. 2004) benutzten anaerobe Bedingungen lediglich in Dunkelheit oder an Blattteilen bzw. isolierten Plastiden, um alternative Elektronentransport-Prozesse in Chloroplasten, wie z.B. die Chlororespiration, zu untersuchen. Zwei andere Studien beschäftigten sich mit dem Erholungsverhalten der Photosynthese nach einer längeren Anoxie-Periode im Dunkeln (Schlüter und Crawford 2001, Schlüter und Crawford 2003).

Weitere Photosynthese-Experimente wurden hauptsächlich an Pflanzen durchgeführt, deren Wurzeln von Sauerstoffmangel betroffen waren, d.h. unter Hypoxie-Bedingungen (z.B.

Kozlowski und Pallardy 1984, Liao und Lin 1996, Albrecht et al. 1997, Ladygin und Semenova 1999, Holmer und Bondgaard 2001, Kawano et al. 2002, Mustroph und Albrecht 2003). Diese zeigten häufig eine Verminderung der Photosynthese-Leistung nach längerer Überflutung. Als Ursachen dieser Photosynthese-Hemmung werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Zum einen ist ein verstärkter Stomata-Schluss nach mehreren Tagen Hypoxie zu beobachten (Terazawa et al. 1992, Else et al. 2001, Ahmed et al. 2002), welcher durch ABA vermittelt wird (Hiron und Wright 1973, Jackson und Hall 1987, Zhang und Davies 1987) und eventuell zu CO₂-Mangel in den photosynthetisch aktiven Zellen führen kann. Eine Verminderung des Fv/Fm-Verhältnisses weist ebenfalls auf verringerte Photosynthese-Leistung bei Überflutung hin (Ahmed et al. 2002). Außerdem kann die bei Hypoxie auftretende Akkumulation von Zuckern und Stärke in den Blättern (z.B. Wample und Davis 1983, Albrecht et al. 2004) zur Hemmung der Photosynthese führen.

1.7 Pyrophosphat als alternativer Energiedonor unter Sauerstoffmangel

Während einer Sauerstoffmangel-Periode kommt es in pflanzlichen Geweben aufgrund der Hemmung der mitochondrialen Atmung zu einem ATP-, d.h. Energiemangel. Seit einiger Zeit wird diskutiert, dass Pflanzen neben ATP auch alternative Energiedonoren, vor allem Pyrophosphat (PPi), nutzen können (Weiner et al. 1987, Stitt 1998). PPi liegt in einer relativ hohen Konzentration im Cytosol vor (0.3 mM, Weiner et al. 1987). Es entsteht bei verschiedenen Biosynthese-Prozessen (Proteine, Stärke, Nukleinsäuren, Cellulose), und wird dabei durch Pyrophosphatasen (PPasen) gespalten, um die jeweilige Reaktion irreversibel gestalten zu können.

Der Energiegehalt von PPi ist etwa halb so hoch wie der von ATP (Weiner et al. 1987, Davies et al. 1993). In der Pflanze existieren für einige Stoffwechselwege parallel zu ATP-verbrauchenden Enzymen auch Enzyme, die PPi als Energiedonor nutzen können (Abb. 5). Im Folgenden sind diese aufgelistet:

- i. Spaltung der Saccharose über Saccharose-Synthase (SuSy) und UDPGlucose-Pyrophosphorylase (UGPase) parallel zu dem Weg über Invertasen und Hexokinasen
- ii. Phosphorylierung von Fru6P über die Pyrophosphat-Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase (PFP = PPi-abhängige Phosphofructokinase) parallel zur ATP-abhängigen Phosphofructokinase (PFK)

- iii. Protonentransport in die Vakuole über die tonoplastidäre PPase (tPPase) parallel zur protonentransportierenden ATPase (vATPase)

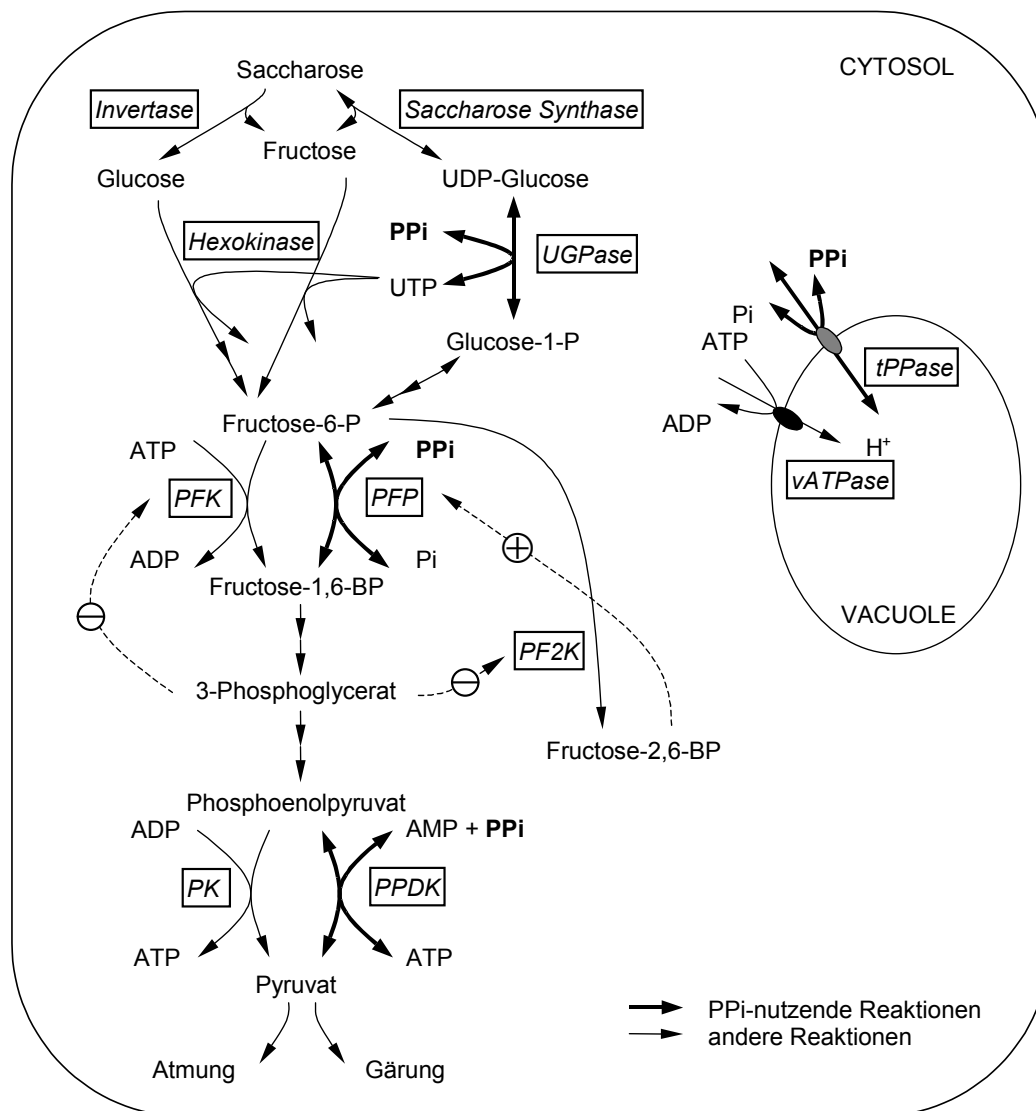


Abb. 5: Pyrophosphat-abhängige Prozesse in heterotrophen Pflanzenzellen. Dargestellt sind die Saccharose-Spaltung, Teile der Glycolyse sowie der Protonentransport in die Vakuole. Außerdem werden regulatorische Schritte gezeigt (gestrichelte Pfeile). Abkürzungen: PF2K, Phosphofructo-2-kinase; PFK, Phosphofructokinase; PFP, Pyrophosphat-Fructose-6-Phosphat-Phosphotransferase; PK, Pyruvat-Kinase; PPDK, Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase; tPPase, tonoplastidäre Protonen-transportierende PPase; UGPase, UDPGlc-Pyrophosphorylase, vATPase, vakuoläre Protonen-transportierende ATPase.

Es konnte für verschiedene Pflanzen gezeigt werden, dass unter Sauerstoffmangel PPi-nutzende Enzyme stärker induziert werden als ATP-nutzende Enzyme (zusammengefasst in Dennis et al. 2000). Allerdings fehlt noch der endgültige Beweis für die Hypothese, dass PPi als alternativer Energiedonor dienen kann. Hintergrund dafür ist, dass die Reaktionen PPi-nutzender Enzyme reversibel sind, wohingegen die ATP-nutzenden Enzyme nur eine

Reaktionsrichtung ausführen. Demzufolge ist bis heute nicht sicher, welche Enzyme bei verminderten Sauerstoffkonzentrationen PPi liefern, und welche PPi verbrauchen (Gibbs und Greenway 2003, Greenway und Gibbs 2003). Eine weitere Frage ist die, wie zusätzliches PPi, das als langfristiger Energiedonor dienen könnte, gebildet werden kann (Drew 1997). Zum einen muss PPi, das bei Biosyntheseprozessen entsteht, zum großen Teil gespalten werden, damit keine Produkthemmung auftritt. Zum anderen sind diese Biosynthese-Prozesse bei Sauerstoffmangel durch den vorhandenen Mangel an ATP nur eingeschränkt aktiv (Greenway und Gibbs 2003).

1.8 Die Rolle der Saccharose-Synthase im Stoffwechsel

Während die Invertasen Saccharose irreversibel zu Glc und Fru spalten, entstehen bei der reversiblen Spaltung durch die Saccharose-Synthase (SuSy) Fru und UDPGlc. Letzteres Endprodukt ist energiereicher als Glc, und wird in einem anschließenden, PPi-nutzenden Schritt zu Glucose-1-Phosphat (Glc1P) und UTP umgewandelt (Abb. 5). Das UTP kann für die Phosphorylierung der Fru genutzt werden. Demzufolge wird bei der Umwandlung von Saccharose in zwei Hexose-Phosphate (HexoseP) nur ein Molekül PPi verbraucht, während der Weg über die Invertasen und Hexokinasen zwei Moleküle ATP nutzt. Demnach wäre bei ATP-Mangel eine Bevorzugung des SuSy-Weges energetisch günstiger für die Pflanze.

Die SuSy ist hauptsächlich in heterotrophen Geweben aktiv, z.B. in jungen Geweben, in Kartoffel-Knollen oder im Endosperm von Gräsern (Chen und Chourey 1989, Wang et al. 1994, Pak et al. 1995, Pfeiffer und Kutschera 1995). Dort spielt sie neben der glycolytischen Funktion eine Rolle bei der Umwandlung von Saccharose zu Stärke (Zrenner et al. 1995, Pozueta-Romero et al. 1999). Außerdem kann die gebildete UDPGlc zur Zellwandsynthese in wachsenden Geweben genutzt werden. In grünen, photosynthetisch aktiven Pflanzen-Geweben ist das Enzym nicht aktiv (Springer et al. 1986). Ausnahme ist das Phloem in einigen Pflanzenarten, z.B. im Mais, wo die SuSy eine Aufgabe bei der Phloem-Beladung haben kann (Martin et al. 1993, Nolte und Koch 1993). Außerdem wird die SuSy in der Pflanze durch Stress induziert (Anoxie, Kälte, Lichtstress: Marañón et al. 1990, Crespi et al. 1991, Ricard et al. 1991).

Für viele bisher untersuchten Pflanzenarten konnte gezeigt werden, dass die SuSy unter Sauerstoffmangel induziert wird, wohingegen die Invertasen in ihrer Aktivität abnehmen (Ricard et al. 1991, Guglielminetti et al. 1995, Perata et al. 1996, Perata et al. 1997, Ricard et

al. 1998, Biemelt et al. 1999, Mustroph und Albrecht 2003, Albrecht et al. 2004). Die SuSy wurde neben den Gärungsenzymen und einigen glycolytischen Enzymen als eines der ANPs im Mais identifiziert (Chourey et al. 1991, Ricard et al. 1991, Sachs et al. 1996). Das nachfolgende Enzym, welches den eigentlichen PPi-verbrauchenden Schritt katalysiert, die UGPase, ist nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion (Kleczkowski et al. 2004). So beschrieben zwar Chang et al. (2000) die UGPase als unter Anoxie produziertes Protein im Mais, in anderen Arbeiten war das Enzym aber unter Sauerstoffmangel nicht verstärkt aktiv (Mustroph und Albrecht 2003).

Die meisten Untersuchungen zur Bedeutung der SuSy unter Sauerstoff-Defizit wurden am Mais durchgeführt. Mais besitzt mindestens drei Isoenzyme (sus1 = sh1, sus2 und sus3). Die ersten beiden Formen wurden schon früh als Sauerstoffmangel-induzierbar beschrieben (Springer et al. 1986, Zeng et al. 1998), während das dritte Enzym erst kürzlich entdeckt wurde (Carlson et al. 2002). Mit Hilfe von Doppel-Mutanten von sus1 und sus2 konnte gezeigt werden, dass die SuSy im Mais eine wichtige Rolle in der Glycolyse unter Anoxie spielt (Ricard et al. 1998). Allerdings wiesen Kartoffel-Pflanzen, deren SuSy-Aktivität durch einen antisense-Ansatz vermindert war, keine Veränderungen im Stoffwechsel unter Hypoxie auf. Lediglich das Wachstum nach einer Hypoxie-Periode war in den transgenen Pflanzen deutlich vermindert (Biemelt et al. 1999).

Es gibt Hinweise darauf, dass die SuSy nicht nur Substrate für die Glycolyse liefert, sondern auch Vorstufen für die Zellwand-Synthese, vor allem Cellulose (Amor et al. 1995, Chourey et al. 1998). Hierfür wird die SuSy durch Phosphorylierung membranständig (Carlson und Chourey 1996, Winter et al. 1997, Carlson et al. 2002, Komina et al. 2002). Eine Induktion der SuSy unter Sauerstoffmangel kann also statt einer erhöhten Glycolyse-Rate auch eine Steigerung der Zellwand-Synthese bewirken. Dies konnte für Weizen unter Hypoxie-Bedingungen gezeigt werden (Albrecht und Mustroph 2003).

1.9 Formen der Phosphofructokinase

Die Katalyse von Fructose-6-Phosphat (Fru6P) zu Fructose-1,6-Bisphosphat (Fru1,6BP) ist einer der wichtigsten Schritte in der Glycolyse, sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Organismen (Plaxton 1996). Pflanzen besitzen, im Gegensatz zu Tieren und verschiedenen Bakterien wie z.B. *Escherischia coli*, zwei Formen der Phosphofructokinasen, die PFP und die PFK. Während die PFK ATP nutzt, um Fru6P zu phosphorylieren, benötigt die PFP PPi

für diese Reaktion. Es gibt Hinweise darauf, dass bei Sauerstoffmangel entweder beide Formen induziert werden (unter Hypoxie in Weizen und Mais, Mustroph und Albrecht 2003), oder die PFP bevorzugt vor der PFK induziert wird (unter Anoxie im Reis, Mertens et al. 1990, Mohanty et al. 1993, Umeda und Uchimiya 1994, Minhas und Grover 1999, Gibbs et al. 2000, Kato-Noguchi 2002). Neben diesen beiden Enzymen existiert noch eine Phosphofructo-2-Kinase (PF2K), die den Stoffwechsel-Regulator Fructose-2,6-Bisphosphat (Fru2,6BP) bildet, welcher sich ebenfalls unter Sauerstoffmangel anhäuft (Mertens et al. 1990, Kato-Noguchi und Watada 1996, Kato-Noguchi 2002).

1.9.1 Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6Bisphosphatase

Der Metabolit Fru2,6BP ist ein wichtiges Regulatormolekül in der Glycolyse (Plaxton 1996). In tierischen Organismen wirkt Fru2,6BP fördernd auf die ATP-abhängige Phosphofructokinase und hemmt die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase, Van Schaftingen 1987). In Pflanzen dagegen reguliert Fru2,6BP die Reaktion der PPi-abhängigen Phosphofructokinase, und hemmt ebenfalls die FBPase (Huber 1986, Stitt 1990, Plaxton 1996, Nielsen et al. 2004). Dieser Metabolit fördert demzufolge die Glycolyse bzw. Stärkesynthese, und hemmt die Gluconeogenese bzw. Saccharose-Synthese (Abb. 5, Abb. 6).

Fru2,6BP wird durch ein bifunktionelles Enzym, die Phosphofructo-2-Kinase/Fru2,6Bisphosphatase (PF2K) gebildet. Protein-Eigenschaften und mRNA-Sequenz der PF2K wurden bisher für verschiedene Pflanzen beschrieben, z.B. Kartoffel (Draborg et al. 1999), Spinat (Larondelle et al. 1986, Walker und Huber 1987, Markham und Kruger 2002) und *Arabidopsis* (Villadsen et al. 2000, Villadsen und Nielsen 2001, Kulma et al. 2004). Die Kinase-Aktivität der PF2K, und somit die Bildung von Fru2,6BP, wird durch verschiedene Metabolite stark reguliert (zusammengefasst in Nielsen et al. 2004). 3-Phosphoglycerat (3PGA), PEP und PPi hemmen die Kinase-Reaktion, während Phosphat und Fru6P die Kinase-Reaktion fördern, und die Phosphatase-Reaktion hemmen. Der Status der Glycolyse reguliert so die Bildung von Fru2,6BP. Sind viele Triose-Phosphate (TrioseP) und wenig HexoseP vorhanden, wird weniger Fru2,6BP gebildet, und die Glycolyse wird gehemmt.

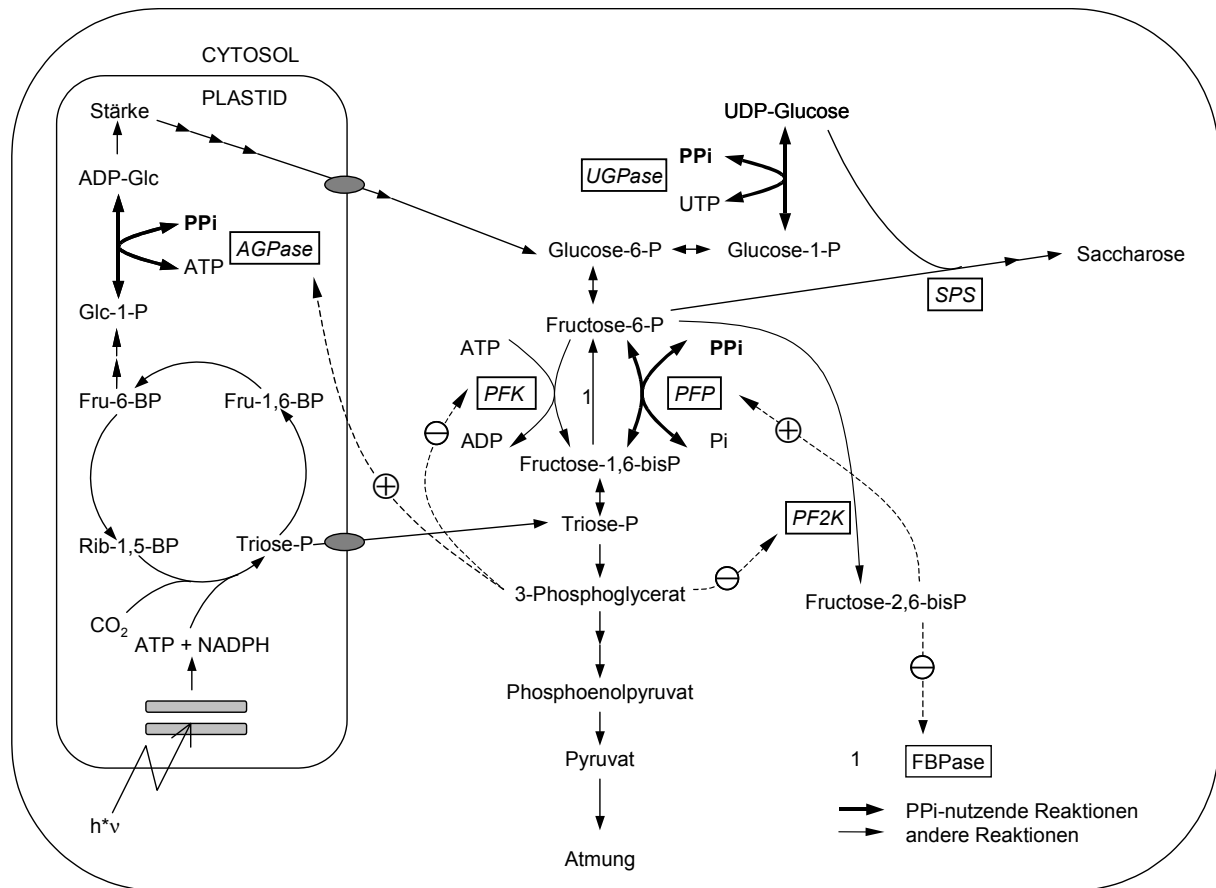


Abb. 6: Schema des primären Kohlenhydrat-Stoffwechsels in photosynthetisch aktiven Blattzellen (modifiziert nach Nielsen et al. 2004). AGPase, ADPGlucose-Pyrophosphorylase; FBPase, Fructose-1,6-Bisphosphatase; PF2K, Phosphofructo-2-Kinase; PFK, ATP-abhängige Phosphofructokinase; PFP, PPi-abhängige Phosphofructokinase; SPS, Saccharose-P-Synthase; UGPase, UDPGlucose-Pyrophosphorylase.

In den bisher untersuchten Pflanzen existiert nur jeweils eine Isoform des Enzyms (Draborg et al. 1999, Villadsen et al. 2000, Kulma et al. 2004), wodurch sich die Herstellung transgener Pflanzen oder Mutanten mit verminderter PF2K-Aktivität vereinfacht. Bisher wurden demzufolge schon mehrere Pflanzen mit geringerer PF2K-Aktivität hergestellt (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001, Rung et al. 2004). Diese zeigten einen verminderten Fru2,6BP-Gehalt in den Blättern, sowie eine Verschiebung des Stoffwechsels von der Stärkesynthese in Richtung Saccharose-Synthese. Transgene Pflanzen mit erhöhten Fru2,6BP-Gehalten bildeten dagegen bevorzugt Stärke statt Saccharose (Scott et al. 1995, Truesdale et al. 1999, Kato-Nohuchi et al. 2001, Fernie et al. 2001). Fru2,6BP spielt also in source-Gewebe höchstwahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation der Verteilung der Photoassimilate.

Sink-Gewebe, vor allem Wurzeln, wurden dagegen in den transgenen Pflanzen noch nicht ausführlich untersucht, und die Bedeutung von Fru2,6BP in diesen Geweben ist noch unklar. Es ist denkbar, dass Fru2,6BP hier die Glycolyse-Rate reguliert (Nielsen et al. 2004). Für

Sauerstoffmangel wird diskutiert, dass Fru2,6BP durch Regulation der PFP eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Glycolyse spielt (Stitt 1998). Einige Pflanzen akkumulieren unter Anoxie Fru2,6BP (Mertens et al. 1990, Kato-Noguchi und Watada 1996, Kato-Noguchi 2002).

1.9.2 PPI-abhängige Phosphofructokinase

Die PFP wurde in Pflanzen um 1979 entdeckt (Carnal und Black 1979). Danach gab es zahlreiche Studien, die sich mit diesem Enzym auseinandersetzen. Das Enzym wurde auf der mRNA-Ebene (*Solanum tuberosum*: Carlisle et al. 1990; *Ricinus communis*: Todd et al. 1995; *Citrus x paradisi*: Kapri und Sadka 1998; *Saccharum officinarum*: Suzuki et al. 2003) sowie auf der Protein-Ebene (*Ananas comosus*: Carnal und Black 1979, Tripodi und Podesta 1997; *Brassica nigra*: Theodorou et al. 1992, Theodorou und Plaxton 1996; *Musa cavendishii*: Turner und Plaxton 2003; *Hordeum vulgare*: Nielsen 1994; *Citrullus lanatus*: Botha und Botha 1991, Botha und Botha 1993a, Botha und Botha 1993b; *Solanum tuberosum*: Kruger und Dennis 1987, Podesta et al. 1994, Teramoto et al. 2000; *Ricinus communis*: Kombrink und Kruger 1984, Kombrink et al. 1984, Podesta und Plaxton 1994; *Lycopersicon esculentum*: Wong et al. 1990; *Triticum aestivum*: Yan und Tao 1984; *Spinacea oleracea*: Theodorou und Kruger 2001) ausführlich untersucht.

Es wurde gezeigt, dass das Enzym aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht, die meist ein Hetero-Tetramer bilden (Yan und Tao 1984, Kruger und Dennis 1987, Botha et al. 1988). Diese Untereinheiten werden mit α und β bezeichnet. Die β -Untereinheit soll die katalytische Funktion beinhalten, während die α -Untereinheit regulatorisch wirken könnte (Yan und Tao 1984, Botha und Botha 1991, Theodorou et al. 1992, Theodorou und Plaxton 1996). Zwei wichtige Eigenschaften zeichnen das Enzym aus. Zum einen ist die katalysierte Reaktion reversibel, und liegt in der Zelle nahe dem Gleichgewicht (Weiner et al. 1987). Es könnte also theoretisch sowohl die Reaktion der PFK als auch die der FBPase ersetzen (Abb. 6). Zum anderen wird das Enzym durch das Molekül Fru2,6BP stark reguliert (Huber 1986, Stitt 1990, Plaxton 1996). Diese Eigenschaften erschweren es, die Funktion des Enzyms in Pflanzen aufzuklären.

Für eine bakterielle PFP wurde gezeigt, dass zwar in *E. coli* die FBPase ersetzt werden konnte, nicht aber die PFK (Kemp und Tripathi 1993). Für das pflanzliche Enzym gibt es widersprüchliche Aussagen. Einige Autoren weisen auf eine glycolytische Funktion hin (Reis,

Anoxie: Mertens 1991, Kato-Noguchi 2002, *Camellia*-Pollen: Nakamura et al. 1992). Andere Autoren beschreiben eine gluconeogenetische Funktion des Enzyms (*Ricinus*-Samen: Kombrink et al. 1984, Erbsen-Samen: Wu et al. 1983, *Citrullus*-Cotyledonen: Botha und Botha 1993b, Mais-Wurzeln: Costa dos Santos et al. 2003). Es ist denkbar, dass sich je nach Stoffwechsel-Zustand der Zelle die Reaktionsrichtung des Enzyms ändern kann (Hajirezaei et al. 1994).

Zum einen kann der Gehalt an PPi die Reaktionsrichtung regulieren (Weiner et al. 1987). Der Befund, dass in einigen Pflanzen PPi unter Anoxie akkumuliert (Dancer und ap Rees 1989), könnte die glycolytische Richtung des Enzyms fördern. Zum anderen spielt Fru2,6BP eine große Rolle bei der Regulation. Es wurde gezeigt, dass Fru2,6BP als Aktivator der glycolytischen Richtung unter Sauerstoffmangel ansteigt (Kato-Noguchi und Watada 1996, Kato-Noguchi 2002). Studien zu Phosphat-Mangel, bei dem es auch zu verringertem ATP-Gehalt kommt, zeigen ebenfalls eine Induktion der PFP und eine Akkumulation von Fru2,6BP (Theodorou et al. 1992, Theodorou und Plaxton 1996).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Bedeutung der PFP unter Sauerstoffmangel. Allerdings ergab eine antisense-Inhibierung des Enzyms in Kartoffeln (Hajirezaei et al. 1994) oder Tabak (Paul et al. 1995, Nielsen und Stitt 2001) keinen deutlichen Phänotyp unter normalen Bedingungen, und die verminderte PFP-Aktivität zeigte keine negativen Auswirkungen auf den Metabolismus von Kartoffel-Knollen unter Sauerstoffmangel (Hajirezaei 1993).

1.9.3 ATP-abhängige Phosphofructokinase

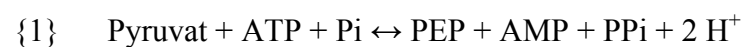
Trotz ihrer wichtigen Rolle bei der Glycolyse (Plaxton 1996) ist über die PFK in Pflanzen noch wenig bekannt. Bisher wurde aus vielen Pflanzen das Protein isoliert (*Musa cavendishii*: Salminen und Young 1975, Nair und Darak 1981, Iyer et al. 1989a, Iyer et al. 1989b, Surendranathan et al. 1990, Surendranathan et al. 1992, Turner und Plaxton 2003; *Daucus carota*: Wong et al. 1987, Moorhead und Plaxton 1992; *Cucumis sativus*: Botha et al. 1988, Cawood et al. 1988; *Solanum tuberosum*: Kruger und Hammond 1988, Kruger et al. 1988; *Ricinus communis*: Garland und Dennis 1980a, Garland und Dennis 1980b, Knowles et al. 1990; *Spinacea oleracea*: Kelly und Latzko 1977, Hausler et al. 1987, Hausler et al. 1989a, Hausler et al. 1989b).

Diese Untersuchungen ergaben, dass weder die Größe des Enzyms, noch die Untereinheiten-Zusammensetzung in den verschiedenen Pflanzen und Organen einheitlich waren. Es wurde aber beschrieben, dass neben cytosolischen auch plastidäre Formen des Enzyms vorkommen (Garland und Dennis 1980a, Garland und Dennis 1980b, Cawood et al. 1988, Knowles et al. 1990, Turner und Plaxton 2003). Die geringe Stabilität des Enzyms verhinderte allerdings bis heute eine Sequenzierung. Eine Aufklärung der Sequenz der PFK wäre ein erster Schritt, um in Zukunft transgene Pflanzen mit gehemmter PFK-Aktivität herzustellen. Diese Pflanzen könnten in Zukunft auch neue Erkenntnisse über die Rolle der PFP ergeben.

1.10 Weitere PPi-nutzende Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel

Unter Sauerstoffmangel kommt es wegen der Lactat-Gärung zu cytoplasmatischer Acidose. Außerdem führt ein verringerter ATP-Gehalt zur Hemmung der Protonen-transportierenden ATPasen. So wird z.B. auch die vakuoläre ATPase (vATPase) gehemmt, und es kommt zusätzlich zu einem Protonenausfluss aus der Vakuole, der die Ansäuerung des Cytosols fördert. Ein PPi-nutzender Protonen-Transporter kann alternativ dafür sorgen, dass bei ATP-Mangel die pH-Regulation länger aufrechterhalten wird (Abb. 5). Bisher wurde nur für Reis gezeigt, dass die tPPase unter Anoxie induziert wird (Carystinos et al. 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass in Mais-Pflanzen die tPPase durch PPi-Synthese aus der PFP (gluconeogenetische Richtung) gespeist wird (Costa dos Santos et al. 2003). Unter Sauerstoffmangel gibt es dazu aber bisher keine Untersuchungen.

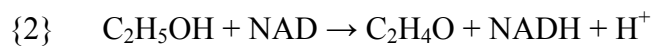
Das Enzym Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) katalysiert die folgende Reaktion (Gleichung {1}):



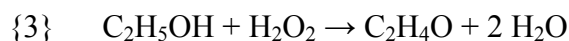
Normalerweise ist das Enzym im C₄-Stoffwechsel involviert, um PEP, einen CO₂-Akzeptor, zu synthetisieren. Interessanterweise ist das Enzym aber im Reis, einer C₃-Pflanze, als Reaktion auf Stressbedingungen induziert, unter anderem auch bei Sauerstoffmangel (Moons et al. 1998). Da parallel auch eine Induktion der Enzyme PEPC und MDH erfolgt, kann das auf eine Rolle der PPDK bei der CO₂-Fixierung und/oder Malat-Bildung unter Sauerstoffmangel hindeuten. Eventuell wäre aber auch in Verbindung mit der Pyruvat-Kinase-Reaktion eine Funktion des Enzyms darin zu sehen, ATP in PPi umzuwandeln (Abb. 5, Greenway und Gibbs 2003).

1.11 Reaktionen von Pflanzen auf Wiederbelüftung

Während einer Sauerstoffmangel-Periode wird wegen der Energie-Armut der Stoffwechsel der Pflanzen auf ein Mindestmaß reduziert. Darunter leiden auch Abwehrsysteme, z.B. das Radikal-Detoxifizierungs-System (Pfister-Sieber und Brändle 1994). Wenn nun nach Ende der Überflutung wieder Sauerstoff verfügbar wird, entstehen in der Pflanze schnell reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 , OH^\cdot und O_2^\cdot (Monk et al. 1987, Yu und Rengel 1999, Biemelt et al. 2000, Blokhina et al. 2001, Ella et al. 2003, Garnczarska und Bednarski 2004). Ein weiteres Problem ist das Ethanol, welches bei Wiederbelüftung sehr schnell zu Acetaldehyd reagieren kann (Crawford und Brändle 1996, Zuckermann et al. 1997). Diese Rückreaktion kann auf zwei Wegen erfolgen (Monk et al. 1987). Zum einen erfolgt eine Umkehrung der ADH-Reaktion:



Zum zweiten kann mit Hilfe der Catalase (CAT) Acetaldehyd entstehen:



Wahrscheinlich ist der zweite Weg in einer Wiederbelüftungsphase der häufigere (Zuckermann et al. 1997).

Sowohl Acetaldehyd als auch Sauerstoff-Radikale können Membranschäden und damit den Zelltod hervorrufen (Crawford et al. 1994, Pavelic et al. 2000). Für einige Pflanzen wurde beschrieben, dass während einer Sauerstoffmangel-Periode Enzyme des antioxidativen Schutzsystems induziert werden, so z.B. Enzyme des Ascorbat-Stoffwechsels (Biemelt et al. 1998), CAT (Yordanova et al. 2003), Glutathion-S-transferase (Moons 2003), Glutathion-Reduktase (Biemelt et al. 1998) und Superoxid-Dismutase (Monk et al. 1987). Außerdem akkumulierten unter Hypoxie Komponenten des antioxidativen Schutzsystems, z.B. Ascorbat und Glutathion (Biemelt et al. 1998). Es wird davon ausgegangen, dass tolerante Arten ein besseres antioxidatives Schutzsystem ausbilden als sensitive Arten. So war die SOD-Aktivität unter Anoxie in der toleranten Art *Iris pseudacorus* 7- bis 25-mal höher als in der intoleranten Art *Iris germanica* (Monk et al. 1987).

1.12 Zielstellung

Die Reaktionen von Pflanzen auf Sauerstoffmangel sind zwar schon häufig Gegenstand der Forschung gewesen, wesentliche Fragen konnten aber noch immer nicht beantwortet werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Primärstoffwechsel von Pflanzen unter unterschiedlich schweren Sauerstoffmangel-Bedingungen besser zu charakterisieren. Dabei sollte der Schwerpunkt auf den Energiestoffwechsel gelegt werden. Betrachtet wurden dabei die Fermentation, die Photosynthese sowie PPi-abhängige Reaktionen.

Die Bedeutung der Gärung für das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel ist noch umstritten. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine detaillierte, vergleichende Untersuchung der Gärungsraten unterschiedlich toleranter Pflanzenarten und -organe unter definierten Bedingungen erfolgen, um die Rolle der Gärung besser zu verstehen. Mit Hilfe eines photoakustischen Laser-Systems (Boamfa et al. 2003) wurden die Ethanol-Gärungsraten von toleranten Reis- und sensitiven Weizenpflanzen unter Anoxie gemessen. Dabei wurden Sprosse und Wurzeln getrennt beobachtet. Diese Untersuchungen wurden außerdem ergänzt durch biochemische Messungen.

Die Photosynthese unter Anoxie wurde bisher nur sehr unzureichend untersucht. Um diese Lücke in der Kenntnis pflanzlicher Stoffwechsel-Reaktionen unter Anoxie zu schließen, sollten in dieser Arbeit einige Photosynthese-Prozesse an toleranten Reis- und sensitiven Weizen-Pflanzen untersucht werden. Dabei wurde neben der Analyse der Gaswechsel-Parameter auch die Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen.

Da sowohl für die SuSy als auch für die PFP noch keine eindeutigen Aussagen über eine Funktion unter Sauerstoffmangel getroffen werden können, und die Bedeutung von PPi ebenfalls noch nicht eindeutig klar ist, sollten in dieser Arbeit zu dieser Thematik verschiedene Experimente durchgeführt werden. Transgene Kartoffel-Pflanzen, die Veränderungen des PPi-Haushaltes aufwiesen, wurden dazu untersucht. Nach mehrtägigem Wachstum unter Hypoxie-Bedingungen wurden Enzymaktivitäten, Metabolit-Gehalte sowie Gärungsraten in den Wurzeln untersucht. Es kamen Pflanzen mit einem verminderten PPi-Gehalt zum Einsatz (UPPa II-2, Hajirezaei und Sonnewald 1999), daneben auch Pflanzen mit geringerer PFP-Aktivität (PFP-RNAi) sowie Pflanzen mit verminderter PF2K-Aktivität (F2,6BP-RNAi).

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

- A Wie hängt die Gärungsrate mit dem Überleben unter Anoxie zusammen?
 - i. Gibt es Unterschiede in der Ethanol-Produktion zwischen Reis und Weizen?
 - ii. Reagieren Sprosse und Wurzeln unterschiedlich auf Sauerstoffentzug?
 - iii. Wie hängen Gärungsrate, Energiehaushalt und Kohlenhydrathaushalt zusammen?

- B Spielt Acetaldehyd als toxisches Zwischenprodukt der Ethanol-Gärung eine Rolle bei der Anoxie-Toleranz?
 - i. Unterscheiden sich Reis und Weizen in der Acetaldehyd-Produktion?
 - ii. Gibt es Unterschiede zwischen Dunkelheit und Belichtung?
 - iii. Wie viel Acetaldehyd wird bei der Wiederbelüftung gebildet?

- C Welche Bedeutung haben photosynthetische Prozesse unter Anoxie?
 - i. Gibt es Unterschiede in der Gärungsaktivität zwischen Licht und Dunkelheit?
 - ii. Reagieren Reis und Weizen im Licht unterschiedlich?
 - iii. Funktioniert die Photosynthese unter Anoxie unverändert?

- D Ist Pyrophosphat ein alternativer Energiedonor bei Sauerstoffmangel?
 - i. Reagieren Pflanzen mit vermindertem PPi-Gehalt sensitiver auf Hypoxie?
 - ii. Welche Rolle spielt PPi bei der Reaktion der SuSy unter Hypoxie?
 - iii. Hat PPi-Mangel Einfluss auf die PFP-Reaktion unter Hypoxie?

- E Was ist die Funktion der PFP in Kartoffel-Pflanzen?
 - i. Verursacht eine Hemmung der PFP Veränderungen im aeroben Stoffwechsel von Kartoffelpflanzen?
 - ii. Wirkt sich die PFP-Hemmung auf die anaerobe Glycolyse aus?
 - iii. In welcher Richtung verläuft die Reaktion der PFP bei Belüftung und Hypoxie?
 - iv. Beeinflusst Fru2,6BP die anaerobe Glycolyse?

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, in analytischer Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia (Braunschweig), Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Boehringer Mannheim/ Roche (Mannheim), Bio-Rad (München), Calbiochem (San Diego, USA), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs, Schweiz), New England Biolabs (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Sigma Aldrich (Steinheim) und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

2.2 Pflanzenmaterial und Anzucht

2.2.1 Anzucht von Weizen- und Reis-Sämlingen

Karyopsen von Weizen (*Triticum aestivum* L. cv. Alcedo) und Reis (*Oryza sativa* L. cv. Cigalon) wurden für 4 h in 25 °C warmen Wasser eingequollen und anschließend auf Filterpapier ausgelegt. Nach 2 d Keimung bei 25 °C (Weizen) bzw. 3 d Keimung bei 28 °C (Reis) in Dunkelheit wurden die Keimlinge in abgeschnittene Eppendorf-Gefäße gebracht und in 5-l Eimer mit Knop'scher Nährlösung überführt (Albrecht et al. 1993). Die Nährlösung wurde kontinuierlich mit Luft begast. Die weitere Anzucht erfolgte in einer Phytokammer unter definierten Bedingungen. Während einer 16-h-Lichtperiode bei 22 °C wurden die Pflanzen mit etwa 250 bis 300 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ beleuchtet. Im Verlauf der 8-h-Nacht betrug die Temperatur 17 °C. Reis-Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Ernte 14 Tage alt, Weizen-Pflanzen 9 Tage alt. Zu diesem Zeitpunkt waren jeweils 2 große Blätter ausgebildet, und die Vorräte der Karyopse waren nahezu aufgebraucht.

2.2.2 Anzucht von Kartoffel-Pflanzen

Für weitere Versuche wurden Kartoffel-Pflanzen (*Solanum tuberosum* L.) der Varietäten Desiree und Solara benutzt. Zusätzlich wurden verschiedene transgene Linien untersucht. Zum einen wurde mit Pflanzen gearbeitet, die eine cytosolische Pyrophosphatase (PPase) von *E. coli* unter der Kontrolle eines chimären Promotors (STLS + 35S-CaMV) exprimieren (Hajirezaei und Sonnewald 1999). Diese Pflanzen mit der Bezeichnung UPPa II wurden von Prof. Dr. U. Sonnewald erzeugt und mir freundlicherweise für Versuche zur Verfügung gestellt. Die Linie UPPa II-2 wurde für die Experimente ausgewählt, da sie eine hohe

Expression des PPase-Genes sowie eine deutliche Verminderung des Pyrophosphat-Gehaltes in Knollen gezeigt hatte (Hajirezaei und Sonnewald 1999). Zum zweiten wurden Pflanzen benutzt, deren β -Untereinheit der Pyrophosphat-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase (PFP) mit Hilfe der RNAi-Technik gehemmt war. Die Pflanzen mit der Bezeichnung PFP-RNAi wurden im Labor von Dr. Peter Geigenberger hergestellt. Es wurde mit 4 verschiedenen Linien gearbeitet (PFP#9, #10, #16, #19). Beide Konstrukte waren in die Varietät Desiree transformiert worden.

Außerdem wurden im Verlauf der hier beschriebenen Experimente transgene Pflanzen erzeugt, in denen mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes die 6-Phosphofructo-2-kinase/ Fructose-2,6-bisphosphatase (PF2K) gehemmt werden sollte. Ihre Bezeichnung lautet im Folgenden F2,6BP-RNAi. Diese Pflanzen stammen vom Solara-Wildtyp ab. Die Linien F2,6BP#12, #16, #26, #28, #29 und #30 wurden für die Experimente ausgewählt.

Die Kartoffeln wurden als Stecklinge in steriler Gewebekultur gehalten und alle 4 Wochen auf frisches MS-Medium umgesetzt, das 2% Saccharose und 0.8% Agar enthielt. Die Pflanzen wurden bei 22 °C in einem 16 h-Tag mit $250 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kultiviert. Etwa 2 Wochen nach dem Umsetzen begannen die Stecklinge, neue Wurzeln zu bilden. Für die Versuche wurden 4-6 Wochen alte bewurzelten Stecklinge aus der Gewebekultur in abgeschnittene Eppendorf-Gefäße gebracht und in 5-l Eimer mit belüfteter 2/3%iger Knop'scher Nährlösung überführt. Die Pflanzen wuchsen in einer Phytokammer unter definierten Bedingungen: während eines 16-h-Tages 250 bis 300 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bei 22 °C, während der 8-h-Nacht bei 19 °C. Nach etwa 10 bis 30 Tagen Vorkultur, abhängig von der Wildtyp-Varietät, hatten sich ausreichende Mengen an Wurzelmasse sowie Sprosstrieben gebildet. In diesem Stadium wurden die Experimente durchgeführt.

2.2.3 Stress-Behandlung

Nach der belüfteten Vorkultur wurden entsprechend der Fragestellung verschiedene Stress-Behandlungen durchgeführt (Abb. 7). Einige Pflanzen blieben zur Kontrolle in der belüfteten Nährlösung. Für eine Hypoxie-Situation wurde die Nährlösung der Pflanzen mit Stickstoff aus einer Gasflasche (Messer Griessheim, Krefeld) kontinuierlich begast (Flussrate etwa $0.2 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$). Somit befanden sich die Wurzeln in einer nahezu sauerstofffreien Umgebung, während die Sprosse normal belüftet waren. Diese Behandlung wurde unter den oben beschriebenen Anzucht-Bedingungen durchgeführt und dauerte bis zu 4 Tage.

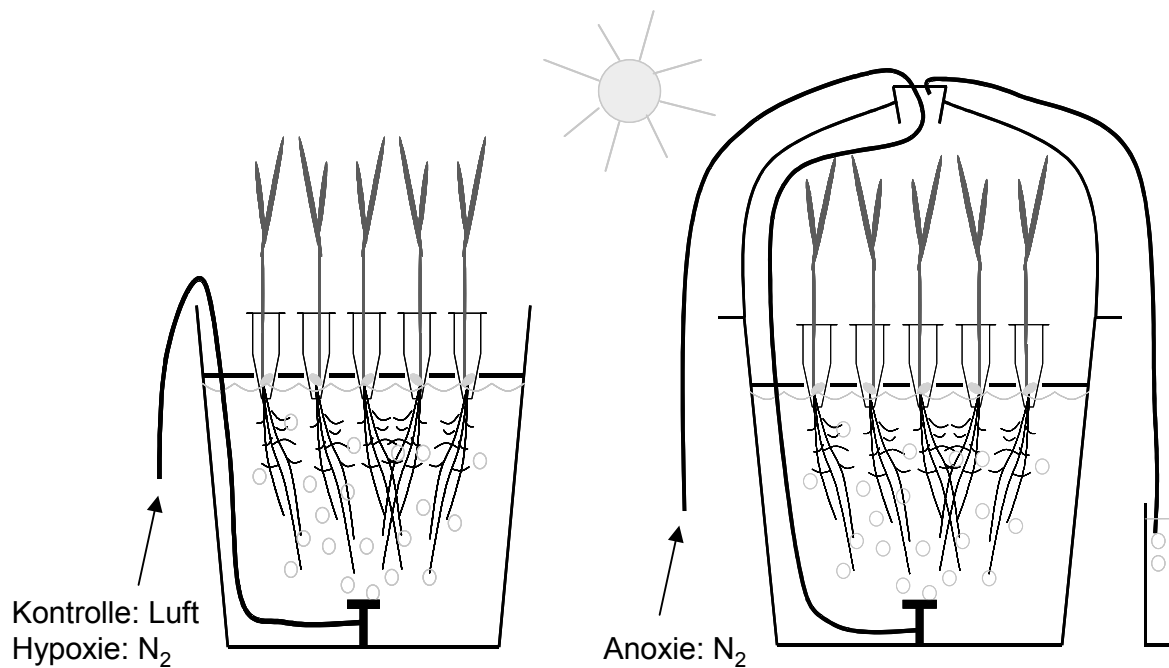


Abb. 7: System zur Anzucht der Pflanzen unter belüfteten Bedingungen, Hypoxie (links) und Anoxie (rechts).

Für eine Anoxie-Behandlung wurden die Pflanzen in einen gläsernen Exsikkator gebracht, der im unteren Bereich mit Nährlösung gefüllt war. Zur Applikation des Stresses wurde die Nährlösung wiederum mit Stickstoff begast, wobei hier durch das abgeschlossene System auch der Spross-Bereich komplett und kontinuierlich sauerstofffrei gehalten wurde. Die Exsikkatoren waren entweder den normalen Belichtungsbedingungen der Phytokammer ausgesetzt oder wurden im Dauerlicht bzw. im Dauerdunkel gehalten. Die Dauer der Behandlung variierte je nach Experiment zwischen 4 h und 2 Tagen.

Nach der jeweiligen Stress-Behandlung wurden die Pflanzen entweder frisch für Versuche genutzt (Wachstum, Glycolyse- und Photosyntheseraten) oder zur weiteren biochemischen Analyse geerntet. Dazu wurden die Pflanzen abgespült und mit Papiertüchern vorsichtig getrocknet. Jeweils 200 mg FW wurde eingewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Analyse der Metabolit-Gehalte und Enzym-Aktivitäten wurde das Gewebe bei -80 °C gelagert. Zwischen Ende der Stress-Behandlung und dem Einfrieren wurde die Zeit möglichst kurz gehalten und lag bei maximal 2 min.

2.2.4 Wachstumsversuche

Für die Wachstumsversuche wurden die Pflanzen, wie oben beschrieben, angezogen und entweder hypoxischen oder anoxischen Bedingungen ausgesetzt. Nach einer Phase des Stresses setzte die Wiederbelüftungsphase ein, die bis zu 4 Tage dauerte. Für einige Versuche wurde jeweils zu Beginn der Stress-Behandlung, zu Beginn der Wiederbelüftung und nach einigen Tagen Wiederbelüftung das Frischgewicht der Pflanzen bestimmt. Dazu wurden die Pflanzen der Nährlösung entnommen und in Spross und Wurzel aufgeteilt. Nach Abtrocknung mit Papiertüchern wurde das Frischgewicht gemessen.

Für andere Versuche wurden dagegen die Überlebensraten der Pflanzen nach Stress erfasst. Dabei wurde 4 Tage nach der Anoxie-Behandlung der Prozentsatz überlebender Pflanzen an der Gesamtzahl der im Experiment eingesetzten Pflanzen ermittelt.

2.3 Biochemische Versuche

2.3.1 Photometrie

Die Enzym-Aktivitätsbestimmungen und einige Metabolit-Messungen (Zucker, Ethanol, Lactat) wurden an einem Photometer (UVIKON, Fa. Kontron) durchgeführt. Einwegküvetten (Schichtdicke 1 cm) mit 1 ml Probenvolumen wurden benutzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die NADH-Bildung oder der NADH-Verbrauch bei 340 nm detektiert.

Für die anderen untersuchten Metabolite wurde ein Zwei-Wellenlängen-Photometer der Marke SIGMA-ZWSII verwendet. Es wurde ebenfalls die Veränderung der NADH- oder NADPH-Konzentration verfolgt. Dabei kamen Glas-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm zum Einsatz. Die Mess-Wellenlänge betrug 340 nm, die Referenzwellenlänge 400 nm.

Die Extinktionsänderungen von NADH wurden mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 6.3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in Konzentrationen ($\mu\text{g} \cdot \text{g FW}^{-1}$ bzw. $\text{nmol} \cdot \text{g FW}^{-1}$) oder Aktivitäten ($\text{nmol} \cdot \text{g FW}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) umgerechnet.

2.3.2 Enzym-Aktivitäten

2.3.2.1 Enzymextraktion

Jeweils 200 mg FW von gefrorenem Wurzel- oder Sprossgewebe wurden in flüssigem Stickstoff gemörst und mit 1 ml 50 mM Hepes-KOH-Puffer (pH 6.8, mit 5 mM Mg-acetat, 5 mM Mercaptoethanol, 15% Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 mM Pefabloc, modifiziert nach Biemelt et al. (1999) homogenisiert. Bis zur Bearbeitung aller Proben wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 15,000 g und 4 °C wurde der klare Überstand für die Enzymbestimmungen in mehreren Portionen bei -80 °C eingefroren. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Dabei wurden 10 µl Extrakt zu 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert und gegen das reine Reagenz bei 595 nm gemessen. Als Standard diente Rinder-Serum-Albumin ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ BSA).

2.3.2.2 Messung der Enzym-Aktivitäten

Die Aktivität der ersten 4 nachfolgend beschriebenen Enzyme wurde nach folgendem System bestimmt: Nach einer zeitlich definierten Reaktionszeit wurde die Konzentration der Reaktionsprodukte im Inkubationsansatz gemessen, und anschließend in eine Aktivität umgerechnet. Die Aktivität der Sauren Invertase wurde ermittelt, indem der Enzymextrakt in 10 mM Na-Acetat, pH 5.0 mit 0.1 M Saccharose genau 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) zur Neutralisation dazugegeben und der Inkubationsansatz bei 95 °C für 5 min denaturiert. Danach wurde nach der unten beschriebenen Methode die gebildete Glc spektrophotometrisch gemessen. Um den Blindwert, d.h. die im Extrakt enthaltene Glc zu messen, wurde die Inkubation sofort nach Zugabe aller Reagenzien bei 95 °C gestoppt. Die Alkalische Invertase im Extrakt wurde in 10 mM Hepes-KOH (pH 7.5) mit 0.1 M Suc genau 1 h bei 37°C inkubiert und danach 5 min bei 95 °C abgetötet. Die Messung der Glc und die Bestimmung des Blindwertes erfolgte wie oben beschrieben. Für die Saccharose-Synthase wurde der Extrakt 30 min in 20 mM Hepes-KOH (pH 7.8) mit 0.1 M Saccharose und 5 mM UDP inkubiert. Die Menge der entstandenen UDPGlc konnte nach der Denaturierung bei 95 °C im 0.2 M Glycin-Puffer (pH 8.7) mit 5 mM MgCl_2 und 0.6 mM NAD durch Zugabe von 0.4 U UDPGlc-Dehydrogenase (UDPGlcDH) bestimmt werden (Zrenner et al. 1995).

Die Pyrophosphatase-Aktivität wurde ermittelt, indem 10 µl Extrakt 10 min in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) mit 10 mM MgCl_2 und 1.3 mM NaPPi inkubiert, und anschließend die

Reaktion bei 95 °C 5 min abgestoppt wurde. Die Blindwerte wurden sofort denaturiert. Das entstandene Phosphat wurde mit dem modifizierten Fiske-Subbarow-Reagenz bestimmt, welches aus 20 ml 0.25 M Ascorbat, 20 ml 10 mM Ammoniummolybdat und 10 ml 6 N Schwefelsäure bestand (Chen et al. 1956). 50 µl des Inkubationsansatzes wurden mit 900 µl frischem Reagenz gemischt, für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 820 nm gemessen. Die Menge an freigesetztem Phosphat wurde mit Hilfe einer Standard-Kurve berechnet.

Die übrigen Enzymaktivitäten wurden direkt durch Messung des Anstiegs oder Abfalls der Extinktion infolge von NADH-Bildung oder -Verbrauch im Reaktionsansatz ermittelt. Dabei wurde vor Zugabe des benötigten Substrates die Blindreaktion für 6 min gemessen, anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Aktivität der UGPase wurde in 80 mM Hepes-KOH (pH 8.0) mit 5 mM MgCl₂, 0.7 mM NAD, 5 µM Gl₁,6BP, 1 mM UDPGlc, 1 U Glc6P-Dehydrogenase (G6PDH) und 1 U Phosphoglucomutase (PGM) gemessen, Start der Reaktion mit 1 mM NaPPi (Sowokinos et al. 1997). Die PGM-Aktivität wurde in 50 mM Hepes-KOH (pH 7.6) mit 1 mM MgCl₂, 24 µM Glc₁,6BP, 0.4 mM NAD und 1.5 U G6PDH gemessen, Start mit 5 mM Glc₁P (Sweetlove et al. 1996). Die Glucokinase-Aktivität wurde in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) mit 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NAD, 10 mM Glc und 2 U G6PDH gemessen, Start mit 2 mM ATP. Die Bestimmung der Fructokinase-Aktivität erfolgte in gleicher Weise, aber mit 2 U Phosphoglucose-Isomerase (PGI) und 10 mM Fru statt Glc (Zrenner et al. 1995).

Die Aktivität der PFK wurde in 100 mM Hepes-KOH (pH 7.9) mit 2 mM MgCl₂, 0.15 mM NADH, 7.5 mM Fru₆P, je 1 U Aldolase, TrioseP-Isomerase (TPI) und Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) gemessen, Start mit 2.5 mM ATP. Der Messpuffer für die PFP enthielt statt MgCl₂ 2.6 mM Mg-Acetat, 1 µM Fru₂,6BP, Start mit 1 mM NaPPi (modifiziert nach Hajirezaei et al. 1994). Die Bestimmung der Aldolase-Aktivität erfolgte in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) mit 1 mM EDTA, 0.14 mM NADH, 1 U TPI und 1 U GDH, Start mit 1.6 mM Fructose-1,6-Bisphosphat (Schnarrenberger und Krüger 1986). Die Aktivität der Enolase wurde in 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0) mit 10 mM MgSO₄, 50 mM KCl, 0.2 mM NADH, 1.1 mM ADP, 3 U LDH und 2 U Pyruvat-Kinase (PK) ermittelt, Start mit 1 mM Glycerin-2-Phosphat (Fox et al. 1995).

Die Bestimmung der PDC-Aktivität erfolgte in 50 mM MES (pH 6.8) mit 25 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM TPP, 2 mM DTT, 0.17 mM NADH, 50 mM Natriumoxamat und 10 U ADH, Start mit 10 mM Pyruvat (Waters et al. 1991). Die ADH-Aktivität wurde in 50 mM TES (pH 7.5) mit 0.2 mM NADH gemessen, Start mit 10 mM Acetaldehyd (Waters et al. 1991). Die LDH-Aktivität wurde in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.0) mit 0.2 mM NADH bestimmt, Start mit 12 mM Pyruvat (modifiziert nach Bergmeyer 1983).

2.3.3 Metabolit-Gehalte

2.3.3.1 Saure Extraktion mit TCA, Variante 1

200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml 10 % TCA (+ 5 mM EDTA) homogenisiert. Nach Inkubation für 1 h auf Eis und Zentrifugation für 15 min bei 15,000 g wurde der Überstand mit etwa 150 µl 4 M KOH neutralisiert. Bis zur Messung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt und für die Bestimmung von Zuckern, Ethanol und Lactat mit Hilfe des UVIKON genutzt.

2.3.3.2 Saure Extraktion mit TCA, Variante 2

200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und zunächst mit 1 ml 16 % TCA (in Ether) extrahiert. Nach 20minütiger Inkubation auf Trockeneis wurden 0.8 ml 16% TCA (in Wasser, + 5 mM EDTA) zugegeben und homogenisiert. Nach Inkubation für 3 h bei 4 °C und Zentrifugation für 10 min bei 15,000 g wurde die Wasserphase in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Extrakt zweimal mit wassergesättigtem Ether gewaschen, um das TCA zu entfernen. Zuletzt wurden die Extrakte mit 5 M KOH in 1 M TEA neutralisiert und bei -80 °C bis zur Messung gelagert (Weiner et al. 1987). Diese Extrakte wurden für die Bestimmung von ATP, Pyrophosphat (PPi), Pyruvat, Phosphoenolpyruvat (PEP), 3-Phosphoglycerat (3PGA), UDP-Glucose (UDPGlc), Glucose-6-Phosphat (Glc6P) und Fructose-6-Phosphat (Fru6P) am Zweiwellenlängen-Photometer benutzt.

2.3.3.3 Saure Extraktion mit HClO₄

200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml 0.83 M HClO₄ extrahiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15,000 g wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 250 µl 1 M Bicin versetzt. Anschließend wurde mit etwa 150 µl 4 M KOH neutralisiert und der entstandene Niederschlag erneut

abzentrifugiert (modifiziert nach Pörs 1999). Die Überstände wurden bei -80 °C gelagert und für die Bestimmung von Zuckern, Glc6P und Pyruvat mit Hilfe des UVIKON und des Zweiwellenlängen-Photometers genutzt. Außerdem wurde ATP mit Hilfe der luminometrischen Methode (2.3.3.7) bestimmt.

2.3.3.4 Alkalische Extraktion

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörstert und mit 50 mM NaOH (+ 0.1 % Triton) extrahiert (Van Schaftingen 1984). Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde das Material für 5 min auf 80 °C erhitzt und anschließend 10 min bei 15,000 g zentrifugiert. Nach der Einstellung eines neutralen pH-Wertes mit 20 mM Hepes/ Essigsäure wurde erneut zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert, bis die Gehalte an Fru1,6BP, Glc1P (beide mittels Zweiwellenlängen-Photometer) sowie Fru2,6BP (mittels IC-MS) gemessen wurden.

2.3.3.5 Extraktion der Stärke

Die Pellets der vorangegangenen sauren Extraktionen wurden je zweimal mit 800 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugations-Schritt wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur etwa 1 h getrocknet. Das Material wurde anschließend mit 800 µl 0,2 M KOH homogenisiert und für 1 h bei 95 °C inkubiert. Nachfolgend wurde das Gemisch mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Von diesem Extrakt wurden je 50 µl mit 100 µl Amyloglucosidase- Lösung in 50 mM Na-acetatpuffer (pH 5.2, 2 mg * ml⁻¹) vermischt und bei 55 °C über Nacht inkubiert (Stitt et al. 1978). Danach wurde der Gehalt an Glucose, wie nachfolgend beschrieben, bestimmt.

2.3.3.6 Spektrophotometrische Bestimmung der Metabolit-Gehalte

Die Metabolite wurden spektrophotometrisch bestimmt, wobei die Extinktion vor dem Reaktionsstart als Blindwert von der Extinktion nach Ablauf der Reaktion abgezogen wurde.

Folgende Metabolite wurden am UVIKON gemessen. Lösliche Zucker wurden in 0.1 M Imidazolpuffer (pH 6.9) mit 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 2 mM NAD und 1 U G6PDH (aus *Leuconostoc*) gemessen. Nach etwa 10 min Wartezeit wurde die Reaktion zur Bestimmung der Glucose mit 0.5 U Hexokinase (HK) gestartet und bei 340 nm verfolgt. Nach Reaktionsstillstand konnte durch Zugabe von 0.2 U PGI die Fructose, und danach durch 60 U

Invertase die Saccharose gemessen werden (Stitt et al. 1989). Für die Stärke war nur die Glucose-Bestimmung nötig. Der Gehalt an Ethanol wurde in 75 mM NaPPi (pH 8.7) mit 75 mM Semicarbazid, 21 mM Glycin und 0.73 mM NAD bestimmt, Start der Reaktion mit 20 U ADH, Reaktionszeit 30 min (Bergmeyer 1983). Lactat wurde in 1 M Glycin (pH 9.5) mit 0.4 M Hydrazin-Sulfat, 5 mM EDTA und 3.6 mM NAD gemessen, Start der Reaktion mit 3 U L-LDH, Reaktionszeit 1 h (Bergmeyer 1983). Pyruvat wurde in 0.5 M Triethanolamin-HCl (pH 7.6) mit 5 mM EDTA und 0.2 mM NADH ermittelt, Start der Reaktion mit 1.5 U L-LDH, Reaktionszeit 20 min (Bergmeyer 1983). Der Gehalt an Glc6P wurde in 0.1 M Imidazol (pH 6.9) mit 5 mM MgCl₂ und 2.5 mM NAD bestimmt, Start der Reaktion mit 0.5 U G6PDH, Reaktionszeit 20 min.

Die folgenden Metabolite wurden am SIGMA-ZWSII bestimmt (modifiziert nach Stitt et al. 1989). Der ATP-Gehalt wurde in 50 mM Hepes-KOH (pH 7.0) mit 5 mM MgCl₂, 0.23 mM NADP, 0.77 mM Glucose, 2 U G6PDH (aus Hefe) und 1 U PGI gemessen, Start der Reaktion mit 1 U HK. PPi wurde in 50 mM Tris-acetat (pH 7.5) mit 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1.5 mM Fru6P, 0.1 mM NADH, 1 U Aldolase, 0.5 U TPI und 0.5 U GDH gemessen, Start der Reaktion mit 0.4 U PFP. UDP-Glucose wurde in 200 mM Glycin (pH 8.7) mit 5 mM MgCl₂ und 0.4 mM NAD gemessen, Start der Reaktion mit 0.4 U UDPGlcDH. Die HexoseP wurden in 50 mM Hepes-KOH (pH 7.0) mit 5 mM MgCl₂ und 0.2 mM NADP bestimmt, Start der Reaktionen nacheinander, für Glc6P mit 1 U G6PDH, für Fru6P mit 1 U PGI und für Glc1P mit 1 U PGM. Fru1,6BP wurde in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) mit 10 mM MgCl₂, 0.1 mM NADH, 1 U GDH und 1 U TPI gemessen, Start der Reaktion mit 1 U Aldolase. Der Gehalt an 3PGA wurde in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) mit 0.1 mM NADH und 3 mM ATP gemessen, Start der Reaktion mit je 1 U Phosphoglycerat-Kinase und GAPDH. Pyruvat und PEP wurden in 50 mM Hepes-KOH (pH 7.0) mit 5 mM MgCl₂, 0.1 mM NADH und 0.75 mM ADP bestimmt, Start der Reaktion nacheinander, für Pyruvat mit 1 U LDH, für PEP mit 1 U PK.

2.3.3.7 Luminometrische Bestimmung der Adenylate

Die Bestimmung der Adenylat-Gehalte erfolgte mit Hilfe des luminometrischen Tests nach Wulff und Döppen (1985) (ATP) bzw. der modifizierten Methode nach Hampp (1985) (ADP, AMP). Für die Messungen wurden die HClO₄-Extrakte, die vorher 1:10 (bei Wurzeln) oder 1:20 (bei Blättern) verdünnt wurden, benutzt. Die Bestimmung erfolgte an einem Luminometer der Marke Biolumat LB 9501 (Fa. Berthold). Das Prinzip der Messung besteht darin, dass das Enzym Luciferase das Substrat Luciferin mit Hilfe von ATP zum

lumineszieren bringt. Pro Molekül ATP entsteht dabei ein Lichtquant von 0.9 hv bei 562 nm. Die Erfassung dieser Lumineszenz erfolgte 10 sec nach dem Start der Reaktion für 5 sec. ADP und AMP wurden nach Umwandlung zu ATP bestimmt. Der Messpuffer für ATP enthielt 25 mM Hepes-KOH (pH 7.8) mit 5 mM Mg-Acetat, 0.15 mM EDTA, 12.6 µM DTT, 0.075 % HSA, 0.28 mM Luciferin und 5 µU Luciferase. Die Umwandlung von ADP in ATP erfolgte innerhalb von 10 min in 6.25 mM Hepes-KOH, pH 7.8 mit 2 mM Mg-Acetat, 0.3 mM PEP und 1 U PK. Die Umwandlung von AMP über ADP zu ATP erfolgte innerhalb von 60 min in 6.25 mM Hepes-KOH, pH 7.8 mit 2 mM Mg-Acetat, 0.3 mM PEP, 5 U Adenylatkinase und 1 U PK.

Die Berechnung der ATP-Konzentration erfolgte mittels einer Eichkurve definierter ATP-Standards. Der „adenylate energy charge“ (AEC) wurde nach Atkinson (1968) aus den Gehalten der einzelnen Adenylate folgendermaßen berechnet:

$$[1] \quad \text{AEC} = \frac{[\text{ATP}] + 0.5 \cdot [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad [\text{rel U}]$$

2.3.3.8 Bestimmung von Fru2,6BP durch IC-MS

Die Menge an Fru2,6BP in den NaOH-Extrakten wurde von Dr. M. Hajirezaei mittels Ionenchromatographie (IC) und anschließender Massenspektrometrie (MS) bestimmt (Chen et al. 2005). Das IC-MS-System bestand aus einem HPLC-System mit einem MSQ-Massendetektor (Dionex, Idstein). Die anionischen Komponenten des Extraktes wurden auf einer 250×2 mm AS11-HC Säule einer 10×2 mm AG 11-HC Vor-Säule aufgetrennt, eine ATC-1 Anionen-Fallen-Säule wurde benutzt, um die Lösungen von Anionen zu befreien. Der Gradient wurde mit Wasser (Puffer A) sowie 100 mM NaOH (Puffer B) in einem Bereich zwischen 4 und 70 % NaOH innerhalb von 30 min mit einer Flussrate von 0.25 ml * min⁻¹ erzeugt. Die Metabolite wurden durch Atmosphärendruck-Ionisierungs-Elektrospray-Massenspektrometrie (Modus für negative Ionen) nachgewiesen.

2.3.4 Bestimmung der Pigmentgehalte

Zur Bestimmung der Gehalte an Chlorophyllen und Carotenoiden wurden 200 mg Blätter mit einer Spatelspitze MgCO₃ in flüssigem Stickstoff gemörst und mit 1 ml 80 % Aceton homogenisiert. Nach Überführung in Eppendorfgefäße wurde für 15 min bei 4 °C und 15,000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, das Pellet erneut mit 600 µl 100 % Aceton

extrahiert. Nach Zusammenführen beider Extrakte wurden die Pigment-Gehalte mittels HPLC gemessen.

Die Pigmentanalyse durch HPLC erfolgte entsprechend einer modifizierten Methode nach Thayer und Björkman (1990) sowie Voitke et al. (1994). Dabei wurden Chlorophyll a, Chlorophyll b, β -Carotin, Lutein, Neo-, Anthera-, Zea- und Violaxanthin aufgetrennt und quantifiziert. Es wurde das HPLC-System Agilent 1100 Series (Hewlett-Packard) benutzt. Die Pigmente wurden in einer RP-18-Säule mit einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetrennt. Folgender Laufmittel-Gradient wurde verwendet:

0 – 1 min isokratisch 100 % A

1 – 34 min linearer Gradient von 100 % A zu 100 % B

34 – 37 min isokratisch 100 % B

37 – 41 min isokratisch 100 % A

Laufmittel A: Acetonitril/H₂O/Triethylamin (180:20:0,2)

Laufmittel B: Ethylacetat

Die Identifikation der Peaks erfolgte anhand von Chromatogrammen, die mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors erstellt wurden. Zur Quantifizierung diente das jeweilige Absorptionsmaximum mittels Standardsubstanzen. Zur Berechnung wurden die Peakflächen mit Hilfe der HPLC-Software integriert.

Aus den Xanthophyll-Gehalten wurde außerdem der De-Epoxidations-Status (DEPS) berechnet:

$$[2] \quad \text{DEPS} = \frac{\text{Zea} + 0.5 * \text{Ant}}{\text{Zea} + \text{Anth} + \text{Vio}} \quad [\text{rel U}]$$

2.4 Gaswechselraten

2.4.1 Messung des Gaswechsels mit dem Warburg-Apparat

Der Warburg-Apparat dient dazu, in einem abgeschlossenen System Veränderungen des Gasdruckes und somit der Gaskonzentration zu messen. Damit ist es möglich, CO₂- und O₂-Ausscheidungen von lebendem Pflanzenmaterial zu untersuchen. Wurzeln von vorbehandelten Pflanzen wurden geerntet und gewaschen. Die Warburg-Gefäße wurden mit 5

ml Wasser gefüllt. In jedes Gefäß kamen 200 mg FW der vorbehandelten Wurzeln. Die Hälfte der Gefäße wurde mit 300 µl 20 % KOH und Papierfächern versehen, um CO₂ absorbieren zu können (Messergebnis: O₂-Aufnahme). Die restlichen Gefäße enthielten nur Wasser (Messergebnis: CO₂-Abgabe + O₂-Aufnahme). Thermobarometer wurden zur Korrektur des äußeren Luftdrucks immer mitgeführt. Es wurden die jeweiligen Veränderungen alle 10 min für insgesamt 90 min bei 21 °C abgelesen. Abschließend wurden die Atmungsraten sowie der Respiratorische Quotient berechnet (Umbreit et al. 1951).

2.4.2 Gärungsraten von Wurzeln im geschlossenen System

Ethanol als Gärungsendprodukt wird schnell und nahezu vollständig von Wurzeln ausgeschieden (Bertani et al. 1980). Um die Menge an gebildetem Ethanol innerhalb einer bestimmten Zeit zu messen, wurde ein geschlossenes System verwendet. Dazu wurden die Wurzeln vorbehandelter Pflanzen gut abgespült und mit Zellstoff abgetrocknet. Je 200 mg FW der abgeschnittenen Wurzeln kamen in kleine Gefäße von 2 ml Inhalt. Dazu wurde mit Stickstoff begastes Wasser gegeben, und die Gefäße möglichst luftblasenfrei verschlossen. Bei Raumtemperatur wurden die Gefäße im Dunkeln inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Wurzeln entnommen, abgetrocknet und eingefroren, ebenso die Lösung. Die behandelten Wurzeln sowie nicht inkubierte Wurzeln (Blindwerte) und die Lösungen wurden, wie oben beschrieben, auf ihren Gehalt an Lactat, Ethanol sowie Zucker untersucht.

2.4.3 Gärungsraten von intakten Pflanzen im offenen System

2.4.3.1 Grundlagen der Messtechnik

In der Arbeitsgruppe von Prof. Frans Harren in Nijmegen/ Holland konnten Ethanol- und Acetaldehyd-Ausscheidungen von intakten Pflanzen bestimmt werden. Dazu wurde ein Laser-basiertes photoakustisches Spurengas-Messsystem mit Detektionsgrenzen von 0.1 nl Acetaldehyd * l⁻¹ Luft und 3 nl Ethanol * l⁻¹ Luft benutzt. Eine detaillierte Beschreibung des theoretischen Hintergrundes ist zu finden bei Zuckermann et al. (1997) und Bijnen et al. (1998). Im Prinzip beruht der photoakustische Effekt darauf, dass gasförmige Substanzen Energie, die vom pulsierenden Anregungslicht des Lasers aufgenommen wurde, in Form von Wärme wieder abgeben. Die pulsierende Wärmeänderung führt in einem konstanten Volumen zu einer pulsierenden Druckveränderung, die durch ein empfindliches Mikrofon detektiert werden kann. Dabei ist das photoakustische Signal direkt proportional zur Konzentration des

gasförmigen Stoffes. Dieser Effekt wurde von Graham Bell erstmals 1880 beschrieben. Verschiedene Gase können unterschieden werden, weil sie bei verschiedenen Anregungs-Wellenlängen absorbieren.

Die praktische Anwendung dieser Messmethode für intakte Pflanzen wurde im Detail von Boamfa et al. (2003) beschrieben. Der schematische Aufbau des Systems ist in Abb. 8A gezeigt. Grundsätzlich gibt es in diesem System drei Messplätze. Jeder davon wird von einem konstanten Luftstrom durchflossen, in dem die jeweilige Gaskonzentration alle 5 min mit dem Laser-System gemessen wird. In diesem Gasstrom befindet sich ein abgeschlossenes Glasgefäß mit den zu untersuchenden Pflanzen. Der Gasstrom wird zunächst durch einen CO₂/ O₂-Detektor geleitet. Dieses Gerät (URAS 14, Hartmann und Braun, Frankfurt) hat für CO₂-Messung durch Infrarot-Gasanalyse (IRGA) eine Messgrenze von 1 µl * l⁻¹ Luft und für O₂-Messungen durch eine Sauerstoffelektrode eine Messgrenze von 0.01 %. Kurz vor der photoakustischen Messung wird der Luftstrom erst durch ein Peltier-Element auf 0 °C, und dann durch flüssigen Stickstoff auf -50 °C abgekühlt, um störenden Wasserdampf zu entfernen.

Das System kann entweder mit Luft oder mit Stickstoff begast werden. Um Unterschiede der Messung durch unterschiedliche Gassorten zu vermeiden, wurde neben der Messküvette eine leere Küvette benutzt. Jeweils floss durch eine Küvette Luft, und durch die andere Küvette Stickstoff. Beide Ströme wurden am Ende vereint. Während der Messung konnten die beiden Ströme beliebig umgeschaltet werden.

2.4.3.2 Durchführung der Messungen

Für die Messungen wurden verschiedene Messküvetten verwendet. Einmal benutzten wir Glas-Küvetten für ganze Pflanzen, die mit 15 ml Wasser gefüllt waren (Abb. 8D). Zum anderen wurden geteilte Küvetten genutzt, die separate Gaszu- und -ausgänge besaßen. Dafür wurden intakte Pflanzen in einen aufgeschnittenen Gummistopfen gebracht, der die zwei Kompartimente teilte (Abb. 8B, E). Dabei befand sich das gesamte Wurzelsystem in der unteren Küvette, und die Blätter im oberen Teil. Mit Terostat (Terostat-IX, Henkel Teroson, Heidelberg) wurden verbleibende Lücken abgedichtet. Die Wurzel-Küvette enthielt 30 ml Wasser, durch welches der Gastrom geleitet wurde.

Die Messungen wurden an 14-Tage-alten Reis- und 9-Tage-alten Weizen-Pflanzen durchgeführt. Es wurden jeweils 6 Reis-Pflanzen oder 3 Weizen-Pflanzen pro Küvette verwendet, um Frischmassen zwischen 1 und 2 g zu erreichen. Bei den Zwei-Kompartimenten-Küvetten wurden die in den Küvetten vorhandenen Pflanzenteile nach der Messung abgeschnitten und gewogen, um die Messwerte auf das FW beziehen zu können.

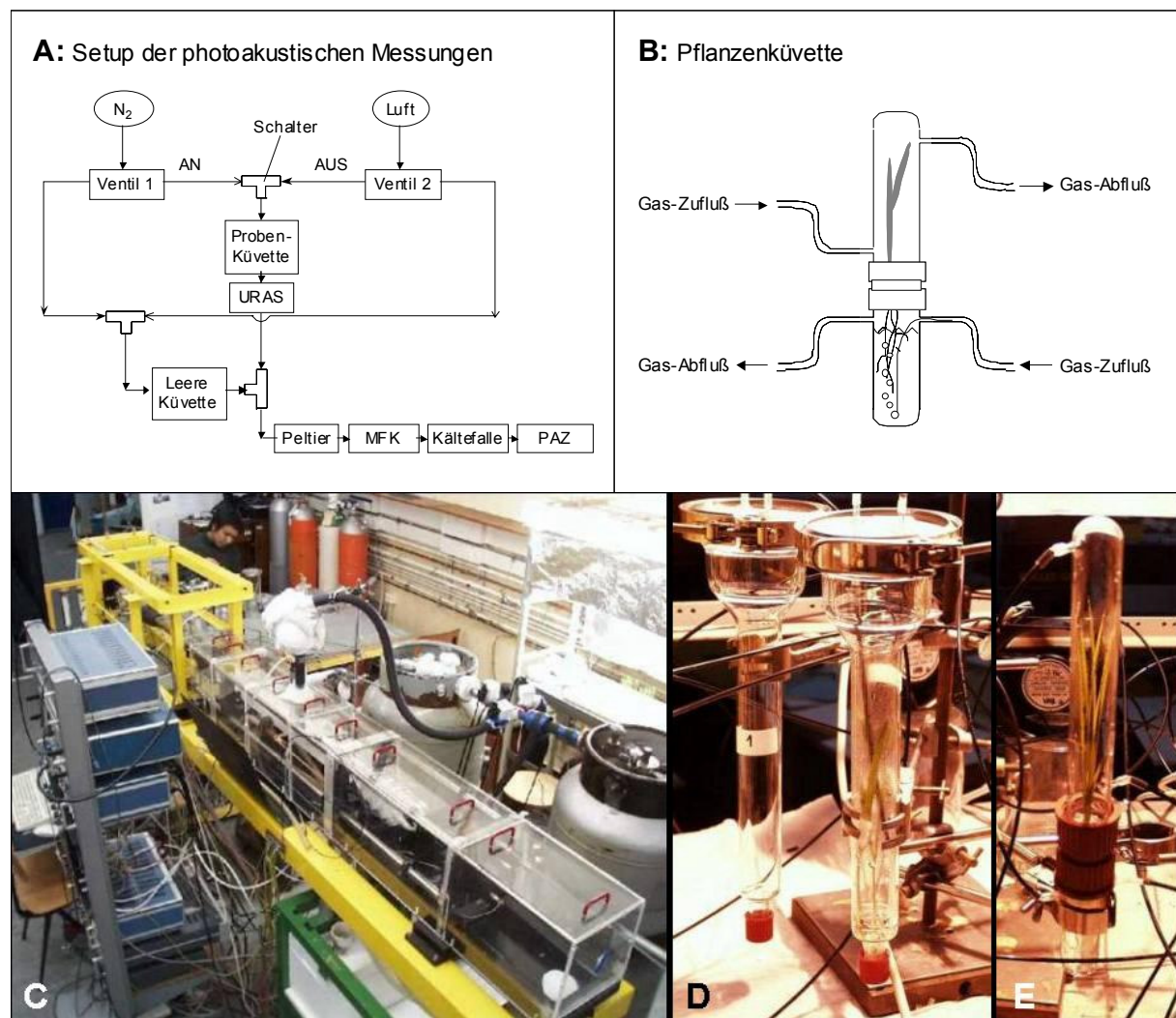


Abb. 8: Schematischer Aufbau des Photoakustischen Messsystems. A: Setup für die Messungen. URAS, CO₂-Analysator; MFK, Massenfluss-Kontrolle; PAZ, Photoakustische Zelle; B: Schema der Zwei-Kompartimenten-Küvette für separate Spross- und Wurzel-Messungen. C: Abbildung des Lasers; D: Ganzpflanzenküvette; E: Zwei-Kompartimenten-Küvette.

Zu Beginn jeder Messung wurde die Ethanol- und Acetaldehyd-Produktion für etwa 1 h in Luft gemessen, anschließend wurde auf Stickstoff-Strom umgeschaltet. Über mindestens 3 bis maximal 24 h wurden die Ethanol-, Acetaldehyd-, CO₂- und O₂-Ausscheidungen gemessen. Für einen Teil der Experimente wurde nach 4stündiger Anoxie wieder auf Luft-Strom

umgestellt, um Effekte einer Wiederbelüftung zu messen. Die Experimente wurden teilweise in Dunkelheit bei 22 °C durchgeführt, indem die Küvetten mit Alufolie bedeckt wurden. Andere Experimente liefen bei Belichtung mit $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, wobei sich die Küvetten auf 26 °C erwärmten.

2.4.4 CO₂-Austauschraten zur Bestimmung der Photosynthese-Rate

Mit Hilfe eines tragbaren Gaswechsel-Messgerätes (LI-6400, Fa. LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) wurden Netto-CO₂-Austauschraten der Reis- und Weizen-Blätter nach Anoxie bestimmt. Diese Versuche wurden zum großen Teil von Dr. Y. Pörs durchgeführt. Die Blätter intakter, lichtadaptierter Pflanzen wurden in eine Messküvette eingespannt. In einem offenen System wurden durch Differenzmessung mit einem Infrarot-Gasanalysator (IRGA) die CO₂- und H₂O-Austauschraten gemessen. Die Temperatur in der Blattküvette betrug 22 °C, die relative Luftfeuchte ca. 50%, die CO₂-Konzentration 360 ppm, die Durchflussrate $400 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Bestrahlung während der Messungen wurde durch eine LED-Lampe (6400-02B) mit 10% Blaulicht und 90% Rotlicht erreicht. Bei den Messungen wurde die Photosyntheserate in Abhängigkeit von der photosynthetisch wirksame Photonenflussdichte (PPFD) zwischen 1500 und 20 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt. Die Messwerte für jede PPFD stabilisierten sich innerhalb von 2 bis 4 min. Am Ende jeder Lichtsättigungskurve wurde die Dunkelatmungsrate (R_D) nach 5 min Adaptation gemessen. Die Lichtsättigungskurven der CO₂-Aufnahme wurden nach Schulte (1993) mit Hilfe der Formel [3] modelliert. Die folgenden Parameter wurden aus den somit errechneten spezifischen Konstanten A, B und C nach den Formeln [4] bis [6] (Caemmerer und Farquar 1981) berechnet: Maximale CO₂-Aufnahmerate ($J_{\text{CO}_2\text{-max}}$), Netto-CO₂-Aufnahmerate unter Wachstumsbedingungen bei 320 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (J_{CO_2}) und maximale apparente Quantenausbeute ($\Phi_{\text{CO}_2\text{-app}}$). $\Phi_{\text{CO}_2\text{-app}}$ beinhaltet den Quotienten aus aufgenommenen CO₂-Molekülen und mol der auftreffenden Photonen in der linearen Region der Lichtsättigungskurven.

$$[3] J_{\text{CO}_2} = f(\text{PPFD}) = A - e^{B \cdot (-\text{PPFD})} \cdot C \quad [\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$[4] J_{\text{CO}_2\text{max}} = A \quad [\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$[5] J_{\text{CO}_2} = f(\text{PPFD}) = A - e^{B \cdot (-320)} \cdot C \quad [\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$[6] \Phi_{\text{CO}_2\text{-app}} = f(J_{\text{CO}_2} = 0) = e^{\ln\left(\frac{A}{C}\right)} \cdot B \cdot C \quad [\text{mol CO}_2 \cdot (\text{mol Photonen})^{-1}]$$

Neben Messungen an belüfteten Kontrollpflanzen von Reis und Weizen wurden Messungen direkt nach unterschiedlichen Zeiten der Anoxie durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen kurz vorher dem Exsikkator entnommen. Außerdem wurden Messungen der Photosyntheserate auch nach einer 24stündigen Erholungsphase an der Luft durchgeführt.

2.4.5 Chlorophyll-Fluoreszenzinduktionskinetiken

Neben der Messung des CO₂-Gaswechsels wurden an den Pflanzen auch Chl-Fluoreszenzmessungen vorgenommen. Mit dem PAM-Fluorimeter (PAM 2000, Firma Walz) ist es möglich, u.a. *quench*-Analysen durchzuführen, die Rückschlüsse auf die Effizienz der photosynthetischen Primär-Prozesse ermöglichen. 30 min dunkeladaptierte Blätter wurden in eine Messküvette eingespannt und mit nicht photosynthetisch aktivem Messlicht bestrahlt, wobei die Grundfluoreszenz (F₀) aufgezeichnet wurde. Nach einem kurzen sättigenden Puls wurde die maximale Fluoreszenz ermittelt (F_M). Anschließend wurde kontinuierlich photosynthetisch aktives (=aktinisches) Licht gegeben, was nach einem schnellen Anstieg zu einem langsamen Abfall der Fluoreszenz führte (F_T). Dieser Abfall wird als quenching bezeichnet und ist begründet in einem Abführen der Energie zu photochemischen Reaktionen (q_P) oder nichtphotochemischen Prozessen (q_N). Alle 2 min wurden nun sättigende Pulse gegeben (F_M'). Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes und Bestrahlung mit „far red“-Licht zur Anregung von PSI wurde wieder die Grundfluoreszenz im lichtadaptierten Zustand (F₀') sowie nach Ausschalten des Messlichtes der Nullwert erreicht. Diese Messungen wurden an belüfteten Kontrollpflanzen, an dem Exsikkator entnommenen Pflanzen sowie an Pflanzen nach einer 24stündigen Wiederbelüftungsphase durchgeführt.

Aus den ermittelten Daten lassen sich folgende Werte errechnen (Rohacek 2002):

$$[7] \quad \Phi_{\max} = \frac{F_V}{F_M} = \frac{(F_M - F_0)}{F_M} \quad [\text{rel U}]$$

$$[8] \quad \Phi_{\text{PSII}} = \frac{F_V'}{F_M'} \cdot q_P = \frac{(F_M' - F_T)}{F_M'} \quad [\text{rel U}]$$

$$[9] \quad q_P = \frac{(F_M' - F_T)}{(F_M' - F_0')} \quad [\text{rel U}]$$

$$[10] \quad q_N = 1 - \frac{(F_M' - F_0')}{(F_M - F_0)} \quad [\text{rel U}]$$

$$[11] \quad \text{ETR} = 0.5 * \text{PPFD} * \text{abs} * \Phi_{\text{PSII}} \quad [\mu\text{mol e}^- * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}]$$

Dabei gelten folgende Abkürzungen: abs, Absorptionskoeffizient der Blätter (0.79 für Reis und Weizen); ETR, Elektronentransportrate; Φ_{\max} , maximale Quantenausbeute der PSII-Photochemie (dunkeladaptierte Blätter); Φ_{PSII} , apparente Quantenausbeute der PSII-Photochemie (lichtadaptierte Blätter); q_P , photochemisches Quenching; q_N , nicht-photochemisches Quenching.

Daneben wurden Φ_{PSII} und Φ_{\max} auch direkt während der Anoxie unter Anzucht-Bedingungen bestimmt. Dazu wurden die Pflanzen mit durchsichtiger Plastikfolie umschlossen, die mit Stickstoff oder Luft begast werden konnte. Vor Beginn der Stress-Behandlung sowie während einer 6-stündigen Anoxie-Phase wurden im Abstand von 20 min beide Parameter (Φ_{PSII} und Φ_{\max}) entweder nach 30minütiger Dunkeladaptation bzw. im lichtangepassten Zustand mit Hilfe des PAM-Fluorimeters durch die Folie hindurch bestimmt. Störende Effekte der Folie waren durch vorangegangene Kontrollversuche als sehr gering ermittelt worden. Belüftete Kontrollpflanzen befanden sich ebenfalls unter Folie, um die gleichen Messbedingungen zu erhalten. Ein Teil dieser Experimente wurde durchgeführt, nachdem der gepufferten Nährlösung HCO_3^- in Form von 35 mM KHCO_3 und 65 mM NaHCO_3 als CO_2 -Quelle zugegeben wurde.

2.5 Statistik

Für die biochemischen Untersuchungen und die Gaswechselanalysen wurden jeweils zu mehreren Zeitpunkten Anzuchten durchgeführt und geerntet. Von jeder Anzucht wurden mindestens 3 Proben je Variante gemessen. Aus den verschiedenen Werten einer Variante wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) bzw. der Standardfehler (SE) berechnet. T-Tests und F-Tests für die statistische Analyse wurden durchgeführt mit Excel, um signifikante Veränderungen herauszufinden.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Techniken zur Klonierung

Für die Klonierungen wurden Standard-Protokolle verwendet (Sambrook et al. 1989). Es wurden unter anderem folgende Techniken angewendet: Ligation von PCR-Produkten mit Vektoren, Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock (45 sec, 42 °C), Isolierung von DNA-Plasmiden durch Minipräparation aus *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen, Auftrennung von DNA-Fragmenten im

Agarose-Gel, Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mittels Kälteschock (10 sec in flüssigem Stickstoff).

2.6.2 Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe

Zur Extraktion von RNA wurde pflanzliches Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 800 µl Z6-Puffer (8 M Guanidiniumchlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA, pH 7.0) versetzt (Logemann et al. 1987). Nach Zugabe von CIP (Chlorophorm-Isoamylalkohol-Phenol, 25:24:1) und gründlicher Durchmischung wurde 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Durch Zugabe von 1 N Essigsäure und 100 % Ethanol wurde die RNA gefällt. Das nach erneuter Zentrifugation entstandene Pellet wurde zweimal mit 800 µl Na-acetat und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets erfolgte das Auflösen in DEPC-Wasser. Die RNA-Lösung wurde bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.6.3 Northern-Blot-Analyse

20 bis 30 µg der Gesamt-RNA wurden nach Formaldehyd-/ Formamid-Denaturierung mit Hilfe eines 1.5%igen Formaldehyd-Agarose-Gels aufgetrennt. Färbung mit Ethidiumbromid wurde für die Kontrolle von gleichmäßiger Beladung und intakter RNA verwendet. Der Transfer der RNA auf Nylonmembranen (GeneScreen, NEN, Boston, USA) erfolgte über Nacht durch einen Kapillarblot in 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7.0). Anschließend wurde die RNA auf der Membran durch 30 s UV-Licht fixiert.

Die jeweils zu hybridisierende Sonde, die aus Plasmiden ausgeschnitten worden war, wurde mit Hilfe des High Prime Kit (Roche, Basel, Schweiz) mit ^[32P]dCTP markiert. Die über Gelfiltration gereinigten Sonden wurden nach thermischer Denaturierung für die Hybridisierung eingesetzt. Nach der Prä-Hybridisierung der RNA-haltigen Membran für 2 h bei 65°C im Church-Puffer (7% SDS, 500 mM NaPi, pH 7.2, 1 mM EDTA, 0.5 % BSA) wurde mit der radioaktiv markierten Sonde unter stringenten Bedingungen bei 65 °C hybridisiert (Church und Gilbert 1984) und anschließend bei der gleichen Temperatur mit absteigenden Konzentrationen von Na-citrat-gepufferter NaCl-Lösung (SSC) gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die radioaktiv markierten Banden wurden entweder autoradiographisch auf Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) oder mittels Imaging Plate (Fuji Film Tokyo, Japan; in Deutschland:

Raytest, Straubenhardt) und Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) detektiert.

2.6.4 Semiquantitative PCR

Um die Menge von RNA in einem Gewebe zu bestimmen, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Nach Verdau der RNA-Lösungen mit DNase (Boehringer Mannheim) bei 37 °C für 45 min in einem Puffer aus 100 mM Na-Acetat und 20 mM MgSO₄ wurde die RNA mit CIP (Phenol/Choroform/Isoamylalkohol, 25:24:1) gewaschen, in 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5.2) und 70% EtOH gefällt und in 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Lösen der RNA in DEPC-Wasser wurde eine cDNA-Synthese mit Hilfe von Oligo-dT-Primern und der M-MLV-Reversen Transkriptase (Promega) bei 37 °C für 60 min durchgeführt. Dieser Ansatz wurde nach Hitze-Inaktivierung bei 95 °C für die PCR-Analyse genutzt.

Tab. 1: Verwendete Primer für die semiquantitative PCR-Analyse und für Klonierungen. Fett: Start- bzw. Stopcodon. Unterstrichen: Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Klonierung. Actinprimer nach Romeis et al. (2001), Tubulinprimer nach Fridman und Zamir (2003).

Produkt	Primer	Zyklenzahl	Fragment- größe [bp]
PF2K	5' TCAGATGCCAAGAATGTGATG	35	453
	3' CACCATCATTACAGAGGGTTTCCAAG		
PFK 1	5' <u>GGTACC</u> ATGTCATCTTCTGTTCCAAAC	31	1422
	3' <u>GGATCCT</u> CAGTCGACCCATTTTCATCGTCCCTGGTTCACC		
PFK 2	5' <u>GGTACC</u> ATGGCCGCCGAAACTAGCATC	35	1335
	3' <u>GGATCCT</u> TAGTCGACACCCTTAACGTTTCGTTTCAAATC		
PFK 3	5' <u>GGTACC</u> ATGAGTACTGTGGAGAGTAGC	31	1470
	3' <u>GGATCCT</u> CAGTCGACCTTGGTGATCTCTTTGGTGACTGG		
PFK 4	5' <u>GGTACC</u> ATGGAAGCTTCGATTTTCGTTTC	35	1593
	3' <u>GGATCCT</u> TAGTCGACGATAGAAGAGATCTTCATGTTATC		
PFK 5	5' <u>GGTACC</u> ATGGATGCTCTTTCTCAGGCG	35	1614
	3' <u>TCTAGAT</u> TTAACTAGTGATGAAATCGGGTTCGCCCCGTTGA		
PFK 6	5' <u>GGTACC</u> ATGGCTTCTAATGGCGTGGAC	35	1389
	3' <u>GGATCCT</u> TTAACTAGTGTCGGTAAACTCCGTGGTTCCTTT		
PFK 7	5' <u>GGTACC</u> ATGTCTAGTCCGAGAAGTAAC	31	1458
	3' <u>GGATCCT</u> TTAACTAGTCTTAGTGACCTCTTTAGTCACAGG		
Actin	5' ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA	28	1085
	3' GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG		
Tubulin	5' CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	28	483
	3' TCACCTTCTTCATCCGCAGTT		

Für eine Quantifizierung von cDNA wurde die PCR anschließend unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase (Takara Shouzo, Japan) mit definierten Primern, bei 55 °C Annealing-Temperatur und verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt (Tab. 1). Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel im TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8.0) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle für den Einsatz gleicher RNA-Mengen wurden Actin- bzw. Tubulin-Primer verwendet.

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Die SDS-PAGE wurde modifiziert nach Lämmli (1970) durchgeführt. Von Proteinextrakten (siehe oben, 2.3.2.1) wurde die Konzentration mit Bradford-Reagenz bestimmt. 5 µg Protein wurden auf 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Hilfe eines Semi-Dry Blotters (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) übertragen. Mit Ponceau S wurde eine gleichmäßige Beladung kontrolliert. Nach Absättigung der Membranen mit 3 % BSA in TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) wurde der Antikörper für die *E. coli*-PPase in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen. Nach einem Waschschrift wurde der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen appliziert. Nach Behandlung mit Phosphatase und anschließender Zugabe des Färbe-Reagenzes (Diethanolamin-Puffer mit BCIP und NBT) wurden die markierten Banden sichtbar.

2.6.6 Herstellung des F2,6BP-RNAi-Konstruktes

Aus Kartoffelwurzeln wurde RNA, wie oben beschrieben, extrahiert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Anschließend wurde mittels PCR mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Niederlande) ein 453 bp großes Stück der PF2K amplifiziert, wobei die Sequenz CACC am 3'-Ende für die folgenden Reaktionen angefügt wurde (Primer siehe Tab. 1). Der PCR-Ansatz wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit dem pENTR/dTOPO-Vektor (Gateway System, Invitrogen, siehe Anhang, Abb. 2) ligiert. Anschließend wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf Kanamycin-Platten ausplattiert. Nach Übernachtskultur der gewachsenen Kolonien wurden die Plasmide nach Standard-Prozedur isoliert und positive Klone selektiert.

Mit der gereinigten DNA eines positiven Klons wurde eine Rekombinations-Reaktion nach Firmenprotokoll durchgeführt. Der bereits vorhandene RNAi-Vektor pK7GWIWG2(II) (Karimi et al. 2005), bereitgestellt von Dirk Inze, enthält zwei mögliche Rekombinations-Orte

in sense- und antisense-Richtung (siehe Anhang, Abb. 3). Mit Hilfe des Clonase-Kits (Gateway System, Invitrogen) wurde die Rekombination angesetzt. Anschließend wurde der Ansatz in chemisch kompetente TOP10-*E. coli*-Zellen (Gateway System, Invitrogen) transformiert und auf Chloramphenicol-Platten ausplattiert. Nach Übernachtskultur der gewachsenen Kolonien wurden wiederum die Plasmide nach Standard-Prozedur isoliert. Der Restriktionsverdau mit XbaI ergab 4 positive Klone. Ein Klon wurde ausgewählt, und mit dem gereinigten Plasmid wurden Agrobakterien transformiert. Diese wurden für die stabile Transformation von Kartoffeln (Solara WT) verwendet.

2.6.7 Klonierung der PFKs

Die Strategie zur Klonierung der PFKs wurde von Dr. S. Biemelt entwickelt. Die gesamten Klonierungsarbeiten für die PFKs wurden von C. Börnke und H. Deppner (IPK Gatersleben) durchgeführt. Aus ganzen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde nach der oben beschriebenen Methode RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Anschließend wurden die PFKs mittels PCR mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase (Takara Shouzo, Japan) bzw. der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Niederlande) jeweils mit spezifischen Primern (Tab. 1) für 35 Zyklen bei 55 °C Annealing-Temperatur amplifiziert. Nach Aufreinigung des PCR-Ansatzes wurde dieser mit dem Vektor pCR 2.1 (Gateway System, Invitrogen, siehe Anhang, Abb. 4, bei Amplifikation mit der Taq-DNA-Polymerase) bzw. mit dem Vektor pCR Blunt (Gateway System, Invitrogen, siehe Anhang, Abb. 5, bei Amplifikation mit der Pfu-Polymerase) ligiert. Nach Transformation des Ansatzes in *E. coli* und Aufreinigung des Plasmids wurde das Fragment mit den jeweiligen Restriktionsfragmenten ausgeschnitten und in den Vektor pbinAR (Höfgen und Willmitzer 1990) kloniert. Nach erneuter Amplifikation dieses Konstruktes in *E. coli*-Zellen und Aufreinigung des Plasmides wurden damit kompetente *Agrobacterium*-Zellen transformiert. Diese wurden für die transiente Expression in Tabak-Blättern verwendet.

2.6.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Kontrolle der amplifizierten Produkte wurden Sequenzierungen durchgeführt. Diese erfolgten als Serviceleistung im Sequenzierlabor des IPK Gatersleben auf Geräten des Typs ABI Prism 377 DNA Sequencer (ABI, Foster City CA, USA) nach ABI-Protokollen. Die Sequenzanalyse erfolgte vor allem am Computer mit dem im Internet verfügbaren „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.gov>).

2.6.9 Transformation von Pflanzen

2.6.9.1 Stabile Kartoffel-Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Übernachtskulturen der mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Agrobakterien in YEB-Medium wurden abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml 2YT resuspendiert. Sterile Stücke von jungen Kartoffelblättern wurden in flüssiges MS-Medium mit 2 % Suc gelegt, und mit der Agrobaktériensuspension beträufelt. Nach 2 Tagen Inkubation im Dunkeln wurden die Blätter auf Kallusinduktionsmedium (2 MS mit 1.6 % Glc und $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BA, $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Ticarcillin, $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Kanamycin) übertragen. Nach 1 Woche Inkubation im Licht wurden die Blätter auf Sprossinduktionsmedium (2 MS mit 1.6 % Glc und $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Zeatinribose, $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA, $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ GA₃, $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Ticarcillin, $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Kanamycin) transferiert. Alle 7 bis 10 Tage wurden die Blattstücke auf frisches Sprossinduktionsmedium übertragen, bis sich kleine Sprosse zeigten. Diese wurden zur Induktion der Wurzelbildung auf BAP- und NAA-haltiges 2 MS-Medium mit entsprechenden Antibiotika umgesetzt.

2.6.9.2 Transiente Transformation von Tabak-Blättern mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Methode der transienten Transformation von Tabak-Blättern durch Agrobakterien-Infiltration wurde z.B. beschrieben durch Bendahmane et al. (2000). Über Nacht in 50 ml YEB-Medium (mit Rifamycin, Ampicillin, Kanamycin, 1 mM MES, 20 μM Acetosyringon) angezogene *Agrobacterium*-Kulturen wurden bei 3,500 g und 4°C für 20 min pelletiert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer OD von 1.0 in Infiltrationspuffer aufgenommen (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 0.1 mM Acetosyringon) und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Bakterien-Suspension mit Hilfe von 1-ml-Spritzen mit stumpfem Ende in die Unterseite von Tabakblättern an intakten Pflanzen eingespritzt, so dass das gesamte Blatt infiltriert war. Nach 2 bis 5 Tagen wurden von den infiltrierten Blättern sowie von unbehandelten Kontrollen Blattproben für die Extraktion und Bestimmung von Enzymaktivitäten entnommen.

3 Ergebnisse

3.1 Fermentations-Stoffwechsel von Reis- und Weizen-Pflanzen unter Anoxie

Wegen widersprüchlicher Ergebnisse ist noch immer nicht klar, welchen Einfluss die Gärung auf das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel hat. Um diese Frage besser beantworten zu können, wurden tolerante Reis- und sensitive Weizenpflanzen hinsichtlich ihres Fermentationsverhaltens unter Anoxie verglichen. Außerdem wurde der Einfluss von Licht untersucht.

3.1.1 Gärungsprozesse unter Anoxie in Dunkelheit

3.1.1.1 Gärung ganzer Pflanzen während einer 20stündigen Anoxie-Phase

Zunächst wurde das Gärverhalten ganzer Pflanzen in einer mit Stickstoff begasten Küvette untersucht. Innerhalb von 15 min nach Umschalten des Gasstromes von Luft auf Stickstoff sank der Sauerstoffgehalt von 21% auf 0% (Abb. 15A). Nach 30 min Anoxie zeigten Reis- und Weizen-Pflanzen zunächst Ausscheidung von Acetaldehyd (Abb. 9A). Während Reis-Pflanzen nach 2 h ein Niveau von etwa $0.27 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$ erreichten, und diese Rate bis zum Ende des Experiments beibehielten, zeigten Weizenpflanzen ein anderes Verhalten. Hier bildete sich ein Peak in der Acetaldehyd-Produktion, mit einem Maximum von $0.47 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$ nach 1.5 h. Anschließend fiel die Acetaldehyd-Produktion auf unter $0.1 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$, und zeigte während weiterer 10 h Anoxie eine leichte Tendenz zur Erhöhung der Ausscheidung (Abb. 9A).

Die Ethanol-Ausscheidung der Pflanzen setzte etwa 30 min später ein als die Ausscheidung von Acetaldehyd. Dabei produzierten Reis-Pflanzen mit bis zu $27 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$ 20mal mehr Ethanol als Weizen-Pflanzen (Abb. 9B). Die Ethanol-Produktion von Reis stieg während der ersten 10 h Anoxie an, und blieb dann für den Rest des Experimentes auf diesem hohen Niveau.

3.1.1.2 Fermentationsprodukte von Wurzeln und Sprossen während 4stündiger Anoxie

Die großen Unterschiede in der Fermentation zwischen Reis und Weizen ließen die Frage aufkommen, welches Gewebe für diesen Unterschied verantwortlich war, und was die Ursache dieses Verhaltens sein könnte. Dazu wurde die Gärung in einer Zwei-Kompartimenten-Küvette analysiert (Abb. 8B). Dieser Ansatz ermöglichte das Messen der Gärungsraten getrennt an Wurzeln und Blättern intakter Pflanzen.

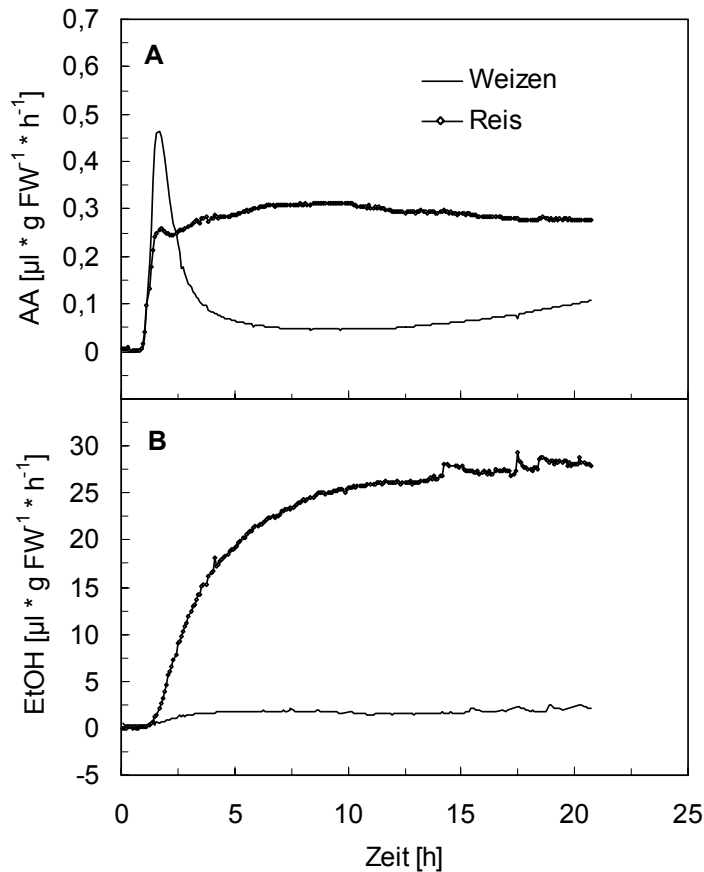


Abb. 9: Langzeit-Gärung in ganzen Pflanzen. Ethanol- (B) und Acetaldehyd-Emissionen (A) von ganzen Reis- (Linie mit Rhomben) und Weizen-Pflanzen (einfache Linie) wurden während einer Anoxie-Periode in Dunkelheit mit der photoakustischen Methode gemessen. Eine repräsentative Kurve wurde aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählt.

Diese Versuche ergaben, dass Acetaldehyd hauptsächlich von den Blättern, und nicht von Wurzeln abgegeben wurde. 92% bzw. 86% der gesamten Acetaldehyd-Menge kam aus den Blättern von Reis bzw. Weizen. Die Acetaldehyd-Produktion von Reis-Sprossen steigerte sich innerhalb von 1.5 h Anoxie auf $2.5 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$, und blieb auf diesem hohen Niveau (Abb. 10A). Weizen-Sprosse zeigten erneut einen Peak in der Acetaldehyd-Ausscheidung, mit einem Maximum von $2.0 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$ nach 1.5 h Anoxie (Abb. 10A). Anschließend fiel die Produktion auf einen Wert von $0.5 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$ nach 4 h Anoxie. Wurzeln von Reis und Weizen zeigten nur einen geringen Anstieg der Acetaldehyd-Ausscheidung (bis zu $0.14 \mu\text{l} * \text{g FW}^{-1} * \text{h}^{-1}$, Abb. 10B). Experimente mit abgeschnittenen Wurzeln oder Sprossen zeigten keine Unterschiede in der Acetaldehyd-Produktion im Vergleich zu intakten Pflanzen (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass kein Transport von Acetaldehyd zwischen den Organen stattfand.

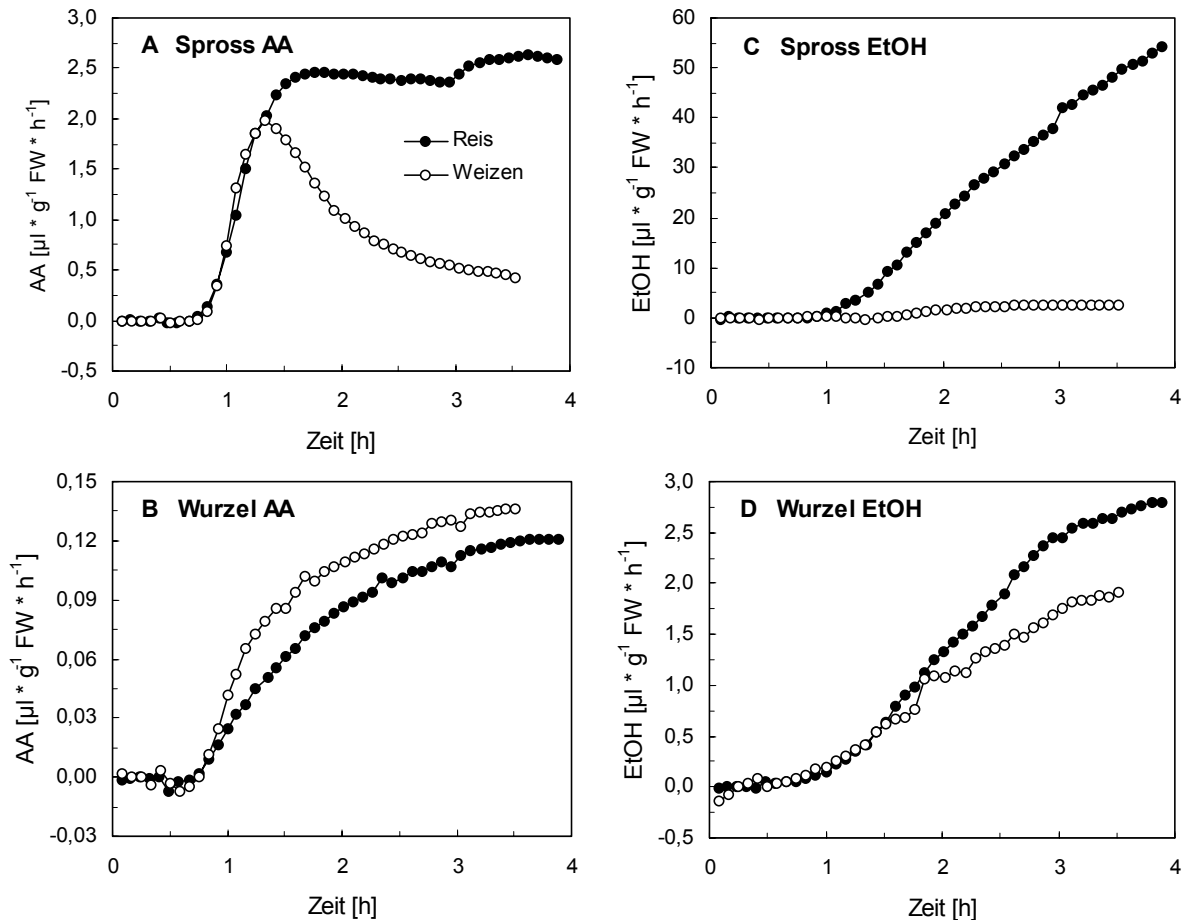


Abb. 10: Fermentation von Sprossen und Wurzeln während einer Anoxie-Phase im Dunkeln. Photoakustische Messung der Ethanol- (C, D) und Acetaldehyd-Ausscheidung (A, B) von Sprossen (A, C) und Wurzeln (B, D) von Reis- (schwarze Kreise) und Weizen-Pflanzen (weiße Kreise) während 4stündiger Anoxie in Dunkelheit. Eine Zwei-Kompartimenten-Küvette wurde genutzt, um die Gärung von Sprossen und Wurzeln getrennt zu betrachten. Eine repräsentative Messung wurde aus 3 bis 6 unabhängigen Experimenten ausgewählt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

Die Ethanol-Produktion stieg in allen Organen relativ gleichmäßig an. Dabei wurden zwischen Weizen-Wurzeln und -Sprossen keine signifikanten Unterschiede in der produzierten Ethanol-Menge beobachtet ($2.0 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, Abb. 10C, D). Im Gegensatz dazu schieden Reis-Sprosse deutlich höhere Ethanol-Mengen aus als Reis-Wurzeln ($50 \mu\text{l} \cdot \text{g} \text{FW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $2.5 \mu\text{l} \cdot \text{g} \text{FW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach 4 h Anoxie, Abb. 10C, D). Während also die Gärungsraten in Wurzeln beider Arten ähnlich hoch waren, war die Gärungsrate der Reis-Sprosse 23mal höher als die der Weizen-Sprosse.

In dem Maße, wie die Ethanol-Gärung induziert wurde, sank die CO_2 -Abgabe der Pflanzen ab. Nach 4 h Anoxie im Dunkeln fiel die CO_2 -Abgabe von Wurzeln und Sprossen im Weizen auf 43% und 24% der Werte unter Belüftung (Tab. 2). Im Reis erreichten die CO_2 -Abgabe-

Raten nach 4 h Anoxie 93% und 36% der aeroben Werte. Aus den CO₂-Daten ergibt sich der Pasteur-Quotient (PQ). Er beinhaltet das Verhältnis von anaerober zu aerober CO₂-Produktion (Albrecht und Wiedenroth 1994, Summers et al. 2000), und ist ein Maß für die Veränderung der Glycolyse-Raten unter Anoxie:

$$[12] \quad PQ = \frac{3 * CO_{2 \text{ anaerob}}}{CO_{2 \text{ aerob}}} \quad [\text{rel U}]$$

Wenn der PQ größer als 1.0 ist, ist dies ein Zeichen für einen erhöhten Glycolyse-Fluss unter Anoxie. Für Weizen-Pflanzen wurde weder in Sprossen noch in Wurzeln eine deutliche Erhöhung der anaeroben Glycolyse-Rate festgestellt. Dagegen zeigten die PQ-Werte von 3.44 für Reis-Wurzeln sowie 1.90 für Reis-Sprosse nach 4 h eine Erhöhung der anaeroben Glycolyse-Rate, und somit einen Pasteur-Effekt.

Tab. 2: CO₂-Produktion [$\mu\text{l} * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1} \text{FW}$] von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen sowie 2 und 4 h nach Beginn der Anoxie in Dunkelheit. Gezeigt werden die CO₂-Ausscheidungsrate und die Pasteur-Quotienten ($PQ = 3 * \text{anaerobes CO}_2 / \text{aerobes CO}_2$) jeweils für Wurzeln und Sprosse. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 4 bis 5 Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		CO ₂ [$\mu\text{l} * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1} \text{FW}$]		PQ [rel U]	CO ₂ [$\mu\text{l} * \text{h}^{-1} * \text{g}^{-1} \text{FW}$]		PQ [rel U]
		Kontrolle	2 h Anoxie	2 h Anoxie	4 h Anoxie	4 h Anoxie	
Reis	Spross	782 \pm 214 ^b	410 \pm 27 ^a	2.26 \pm 0.83 ^A	285 \pm 59 ^a	1.90 \pm 0.96 ^A	
	Wurzel	302 \pm 91 ^a	239 \pm 39 ^a	2.88 \pm 0.78 ^B	280 \pm 48 ^a	3.44 \pm 0.92 ^B	
Weizen	Spross	469 \pm 142 ^a	145 \pm 11 ^c	1.26 \pm 0.39 ^A	112 \pm 15 ^c	0.97 \pm 0.29 ^A	
	Wurzel	360 \pm 75 ^a	173 \pm 18 ^c	1.66 \pm 0.40 ^A	153 \pm 22 ^c	1.51 \pm 0.44 ^A	

3.1.1.3 Aktivität der fermentativen Enzyme ADH und PDC

Die beobachteten Unterschiede der Gärungsraten zwischen Reis- und Weizen-Sprossen warfen die Frage auf, was die Ursache dieser Unterschiede war. Um dies zu klären, wurden verschiedene biochemische Parameter untersucht, vor allem Enzymaktivitäten und Kohlenhydrat-Gehalte.

In beiden Arten waren die Aktivitäten der Gärungsenzyme ADH und PDC in Wurzeln von belüfteten Kontrollpflanzen deutlich höher als in Sprossen. Während die maximale ADH-Aktivität in Wurzeln von Weizen 50% höher war als in Wurzeln von Reis, unterschied sich die PDC-Aktivität der Wurzeln beider Arten nicht signifikant (Tab. 3). Im Gegensatz dazu

waren die ADH- und PDC-Aktivitäten in Sprossen von Reis-Pflanzen 3- bis 4mal höher als in Weizen-Sprossen.

Tab. 3: Aktivitäten der Gärungsenzyme ADH und PDC [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) in Dunkelheit. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 5 bis 10 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		ADH	PDC
		[$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	[$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
Reis			
Spross	0 h A	115 ± 17^a	2.84 ± 0.66^a
	4 h A	157 ± 13^a	7.19 ± 1.65^b
	24 h A	230 ± 20^b	16.51 ± 2.21^c
Wurzel	0 h A	279 ± 67^c	9.00 ± 2.29^b
	4 h A	910 ± 356^d	12.41 ± 2.62^b
	24 h A	1300 ± 709^d	55.18 ± 27.73^d
Weizen			
Spross	0 h A	26 ± 7^e	0.59 ± 0.28^e
	4 h A	10 ± 2^f	0.50 ± 0.23^e
	24 h A	8 ± 4^f	0.24 ± 0.18^e
Wurzel	0 h A	435 ± 99^g	6.43 ± 1.82^b
	4 h A	419 ± 123^g	9.79 ± 1.84^b
	24 h A	540 ± 199^g	14.60 ± 5.30^b

Nach 24 h Anoxie stiegen die ADH- und PDC-Aktivitäten in Reis-Wurzeln bis zu 5fach, während sich in Weizen-Wurzeln nur die Aktivität der PDC verdoppelte (Tab. 3). Auch in Sprossen stiegen die ADH- und PDC-Aktivitäten bei Reis 2- und 5fach an im Vergleich zur belüfteten Kontrolle, bei Weizen zeigte sich dagegen eine Verringerung der Aktivitäten der fermentativen Enzyme.

3.1.1.4 Kohlenhydrat-Abbau und Ethanol-Akkumulation in Sprossen und Wurzeln

Die Kohlenhydrat-Gehalte zeigten ebenfalls große Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben. Reis-Sprosse enthielten 7mal mehr Zucker als Wurzeln, während Weizen-Sprosse 3mal mehr Zucker als Wurzeln enthielten (Tab. 4). Daraus resultiert ein etwa 3mal höherer Zuckergehalt in Reis-Sprossen als in Weizen-Sprossen. Besonders die Saccharose-Gehalte

unterschieden sich in den beiden Arten ($7.3 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ für Reis im Vergleich zu $2.7 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ für Weizen).

Während einer 4stündigen Anoxie-Periode wurde der Anstieg der Fermentationsrate (Abb. 10) von einer Verminderung der Zucker-Gehalte begleitet (Tab. 4). Diese sanken jeweils um etwa 40% in Sprossen und Wurzeln. Dabei war aber die absolute Menge an verbrauchten Kohlenhydraten in Sprossen höher als in Wurzeln, und Reis zeigte einen doppelt so hohen Substrat-Abbau wie Weizen (Tab. 4). Weitere Inkubation in Anoxie für 24 h brachte keinen weiteren Abfall in den Hexose-Gehalten, aber die Saccharose-Mengen wurden weiter verringert (Tab. 4). Stärke wurde unter Anoxie nur in Sprossen abgebaut, wobei etwa 65% genutzt werden konnten. Die Wurzeln enthielten generell nur geringe Mengen an Stärke (Tab. 4). Überraschenderweise enthielten Weizen-Sprosse nach 24 h Anoxie deutlich höhere Mengen an Hexosen als unter belüfteten Bedingungen, was darauf hindeutet, dass der weitere Abbau der Kohlenhydrate gehemmt sein könnte.

Tab. 4: Gehalt an löslichen Zuckern, Stärke [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$] und Ethanol [$\mu\text{g} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) in Dunkelheit. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 bis 12 Proben aus 4 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		Glucose	Fructose	Saccharose	Stärke	Ethanol
		[$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$]				[$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$]
Reis						
Spross	0 h A	0.49 ± 0.04^a	0.51 ± 0.04^a	7.27 ± 0.32^a	0.51 ± 0.04^a	10 ± 1^a
	4 h A	0.25 ± 0.04^b	0.30 ± 0.05^b	2.46 ± 0.22^b	0.30 ± 0.05^b	213 ± 38^b
	24 h A	0.48 ± 0.08^a	0.25 ± 0.06^b	0.56 ± 0.07^d	0.18 ± 0.02^c	297 ± 29^b
Wurzel	0 h A	0.06 ± 0.02^c	0.17 ± 0.05^c	0.93 ± 0.09^c	0.14 ± 0.01^c	4 ± 2^c
	4 h A	0.03 ± 0.01^c	0.12 ± 0.03^c	0.27 ± 0.07^e	0.11 ± 0.02^c	5 ± 3^c
	24 h A	0.02 ± 0.00^c	0.03 ± 0.01^d	0.09 ± 0.03^f	0.07 ± 0.02^d	4 ± 2^c
Weizen						
Spross	0 h A	0.59 ± 0.08^a	0.30 ± 0.03^b	2.67 ± 0.16^b	0.71 ± 0.07^c	16 ± 2^a
	4 h A	0.50 ± 0.06^a	0.25 ± 0.03^b	0.60 ± 0.04^d	0.22 ± 0.04^b	72 ± 19^d
	24 h A	1.17 ± 0.15^d	0.52 ± 0.09^a	0.19 ± 0.04^e	0.25 ± 0.05^b	50 ± 8^d
Wurzel	0 h A	0.18 ± 0.02^c	0.24 ± 0.04^b	0.74 ± 0.07^c	0.10 ± 0.01^d	14 ± 2^a
	4 h A	0.10 ± 0.02^f	0.11 ± 0.02^c	0.20 ± 0.04^e	0.07 ± 0.02^d	14 ± 1^a
	24 h A	0.03 ± 0.01^c	0.02 ± 0.00^d	0.11 ± 0.03^f	0.08 ± 0.01^d	14 ± 4^a

Mit der photoakustischen Methode konnte die Menge an Ethanol ermittelt werden, die von den Pflanzen ausgeschieden wurde. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil des gebildeten Ethanols im Gewebe verbleibt, wurde daneben auch noch der Ethanol-Gehalt in den Pflanzen bestimmt. Belüftete Gewebe der Reis- und Weizen-Pflanzen enthielten nur geringe Mengen an Ethanol. Wurzeln von belüfteten Reis- und Weizen-Pflanzen enthielten $4 \mu\text{g} \cdot \text{g FW}^{-1}$ bzw. $14 \mu\text{g} \cdot \text{g FW}^{-1}$ Ethanol, und akkumulierten auch während der Anoxie-Phase kein Ethanol (Tab. 4). Dagegen akkumulierten Sprosse deutliche Mengen an Ethanol. Während Reis-Sprosse nach 4 h Anoxie 20mal mehr Ethanol enthielten als unter Belüftung, waren die Werte im Weizen nur 4mal höher (Tab. 4). Weitere 20 h Inkubation in Anoxie resultierten nicht in einer weiteren starken Akkumulation an Ethanol, was darauf hindeutet, dass die Speicher-Kapazität des Gewebes limitiert ist (Tab. 4).

3.1.1.5 Energie-Haushalt und Überlebensraten nach Anoxie

Die eben gezeigten Versuche ergaben, dass Reis-Sprosse die höchsten Gärungsraten aufwiesen, was durch hohe Aktivitäten der Gärungsenzyme sowie hohe Zuckergehalte verursacht wurde. Um diese Beobachtungen auf den Energiehaushalt der Zelle zu beziehen, wurden die Adenylate sowie die Überlebensraten der Pflanzen bestimmt.

Bereits nach 4 h Anoxie war der Gehalt an ATP und ADP in allen Geweben reduziert (Tab. 5). Während in Weizen-Pflanzen der Verlust an Adenylaten 50% betrug, war die Verminderung im Reis mit 30% geringer. Nach 24 h Anoxie war der Adenylat-Gehalt in allen Geweben mit geringer Gärungsrate (Weizen-Wurzeln, Weizen-Sprosse, Reis-Wurzeln) auf sehr niedrige Werte abgesunken, während Reis-Sprosse, die eine hohe Gärungsrate zeigten (Abb. 9), noch 30% des belüfteten Wertes enthielten. Überraschenderweise war der „Adenylat energy charge“ (AEC) nach Anoxie nur wenig vermindert, was auf eine Regulation dieses Wertes hinweist (Tab. 5).

Diese ATP-Daten können zum Phänotyp der Pflanzen nach Anoxie in Bezug gesetzt werden. Es wurde getestet, ob und wie gut die Pflanzen nach 24 h Anoxie in Dunkelheit das Wachstum wieder aufnehmen können (Abb. 11A, Abb. 12E). Nach 3 Tagen Wiederbelüftung unter normalen Wachstumsbedingungen waren Reis-Sprosse grün und vital, und konnten wieder wachsen. Die Wurzeln dagegen waren abgestorben, und es erfolgte eine Neubildung sprossbürtiger Wurzeln. Weizen-Pflanzen waren nach 24 h Anoxie vollständig abgestorben, und zeigten kein neues Wachstum.

Tab. 5: Gehalte an ATP und ADP [nmol * g FW⁻¹] sowie AEC [(ATP+0.5ADP)/ (ATP+ADP+AMP)] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) in Dunkelheit. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 5 bis 10 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		ATP [nmol * g FW ⁻¹]	ADP [nmol * g FW ⁻¹]	AEC [rel U]
Reis				
Spross	0 h A	91.0 \pm 5.1 ^a	61.9 \pm 6.3 ^a	0.78 \pm 0.02 ^a
	4 h A	60.1 \pm 4.8 ^b	47.4 \pm 6.8 ^a	0.73 \pm 0.05 ^a
	24 h A	33.1 \pm 2.1 ^c	32.5 \pm 2.1 ^b	0.58 \pm 0.02 ^b
Wurzel	0 h A	39.5 \pm 2.1 ^d	23.6 \pm 2.1 ^c	0.79 \pm 0.02 ^a
	4 h A	29.1 \pm 3.0 ^c	11.8 \pm 0.7 ^d	0.84 \pm 0.02 ^a
	24 h A	3.8 \pm 0.6 ^f	3.4 \pm 0.6 ^e	0.65 \pm 0.03 ^b
Weizen				
Spross	0 h A	52.4 \pm 3.7 ^b	45.0 \pm 2.4 ^f	0.66 \pm 0.03 ^b
	4 h A	27.7 \pm 2.9 ^c	30.3 \pm 3.3 ^b	0.65 \pm 0.02 ^b
	24 h A	3.7 \pm 0.3 ^f	2.7 \pm 0.2 ^e	0.72 \pm 0.02 ^b
Wurzel	0 h A	44.2 \pm 2.3 ^d	21.9 \pm 1.9 ^c	0.80 \pm 0.03 ^a
	4 h A	20.1 \pm 1.1 ^e	11.1 \pm 1.2 ^d	0.80 \pm 0.01 ^a
	24 h A	2.8 \pm 0.4 ^f	2.4 \pm 0.3 ^e	0.66 \pm 0.02 ^b



Abb. 11: Zwei-Wochen-alte Pflanzen von Reis und Weizen, die für einen Tag Anoxie unter verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt waren, gefolgt von einer 3-tägigen Wiederbelüftungsphase.

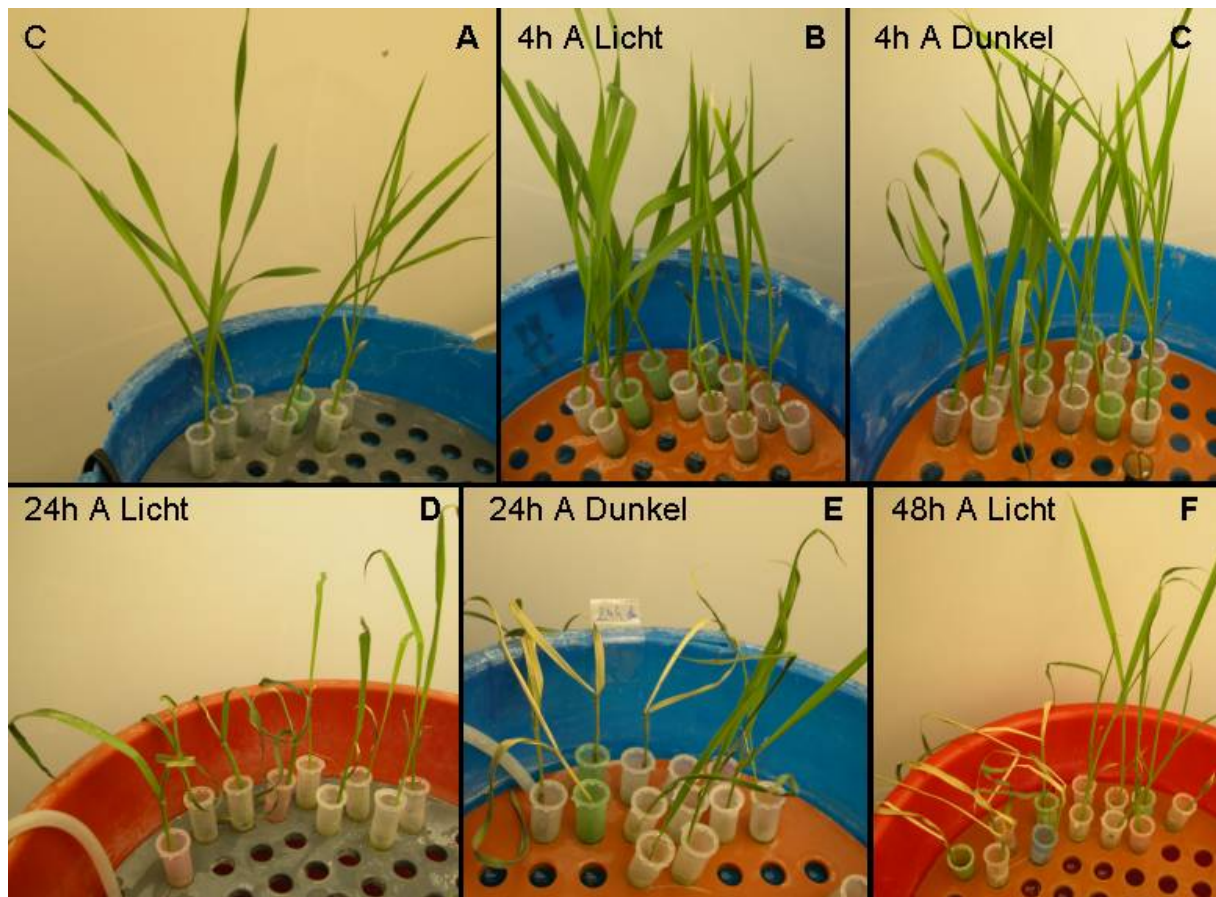


Abb. 12: Weizen- (jeweils links) und Reis-Pflanzen (jeweils rechts), angezogen unter Kontrollbedingungen (C), und behandelt mit 4, 24 oder 48 h Anoxie (A) in Licht oder Dunkelheit. Die Bilder wurden 1 Tag nach Beendigung der Behandlung angefertigt.

3.1.2 Gärungs- und Photosynthese-Prozesse unter Anoxie im Licht

3.1.2.1 Änderung der Fermentationsraten während des Wechsels zwischen Belichtung und Dunkelheit

Licht beeinflusst deutlich das Überleben von Pflanzen unter Anoxie (Mustroph und Albrecht 2003). In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob auch die Gärungsaktivität unter Anoxie vom Licht verändert wird. Zunächst wurde untersucht, wie sich ein kurzzeitiger Wechsel von Licht- und Dunkel-Phasen auf das Gärverhalten auswirkte. Dazu wurden ganze Pflanzen im photoakustischen Lasersystem untersucht. Während einer einstündigen Anoxie-Phase im Licht wurden weder nennenswerte Mengen an Acetaldehyd noch an Ethanol gebildet (Abb. 13A, B). Dagegen reagierten die Pflanzen schon 5 min nach Ausschalten des Lichtes mit einem deutlichen Anstieg der Acetaldehyd-Produktion, die Ethanol-Ausscheidung folgte etwa 20 min später. Die CO_2 -Abgabe war in belichteter Anoxie ebenfalls sehr gering, und stieg in Dunkelheit stark an (Abb. 13C). Nach Wiedereinsetzen der Beleuchtung näherten

sich sowohl Acetaldehyd- als auch CO_2 -Abgabe innerhalb von 15 min den Ausgangswerten unter belichteter Anoxie, während die Ethanol-Produktion weiter anstieg.

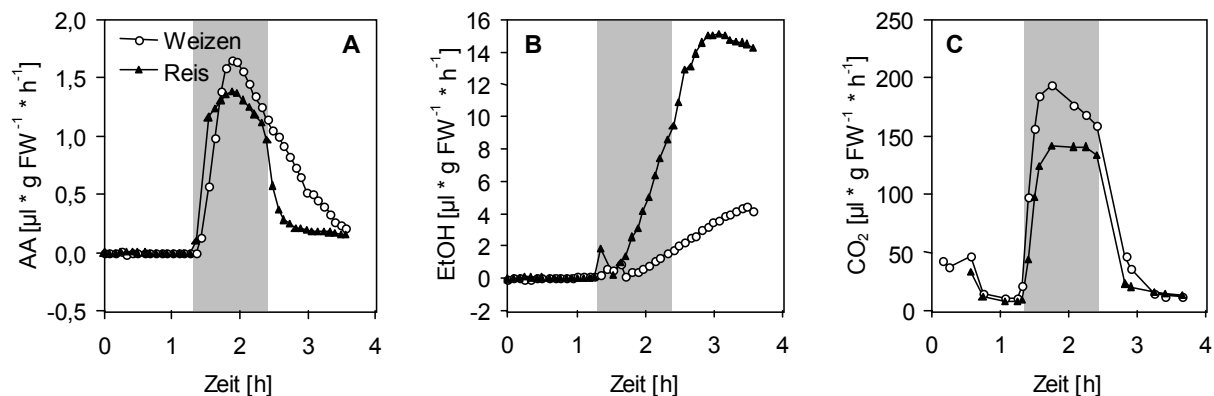


Abb. 13: Gärung während des Wechsels von Licht und Dunkelheit. Ethanol- (B) und Acetaldehyd-Ausscheidung (A) sowie die CO_2 -Exkretion (C) wurden an ganzen Pflanzen von Reis (schwarze Dreiecke) und Weizen (weiße Kreise) in Anoxie gemessen. Die Anoxie-Behandlung begann mit Beleuchtung, nach 1 h wurde das Licht für 1 h ausgeschaltet (grau unterlegt). Eine repräsentative Kurve aus zwei Versuchen wurde ausgewählt.

3.1.2.2 Fermentation während einer 20stündigen Anoxie-Periode in ganzen Pflanzen

Das eben gezeigte Experiment ergab, dass Beleuchtung zumindest bei kurzen Anoxie-Perioden die Fermentation hemmt. In einem längeren Versuch wurde nun getestet, wie sich die Gärung während einer 20stündigen Anoxie-Phase verhielt. Bei kontinuierlicher Beleuchtung schieden weder Reis- noch Weizenpflanzen größere Mengen an Acetaldehyd aus (Abb. 14A). Während Weizenpflanzen außerdem kaum Ethanol während dieser Zeit bildeten, zeigten Reis-Pflanzen nach etwa 2 h einen langsamen Anstieg der Ethanol-Exkretion, die sich nach etwa 8 h auf einem Niveau von $10 \mu\text{l} \cdot \text{g FW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ stabilisierte (Abb. 14B). Somit erreichte Reis auch bei Beleuchtung etwa 10mal höhere Gärungsraten als Weizen, aber nur etwa 30% der Werte in Dunkelheit (Abb. 9).

Erfolgte das gleiche Experiment mit einer 8stündigen Nacht-Periode, setzte bei beiden Pflanzen-Arten die Acetaldehyd-Produktion sofort nach Ende der Beleuchtung ein. Weizen zeigte erneut einen Acetaldehyd-Peak (Abb. 14C), der aber breiter ausfiel als bei kontinuierlicher Dunkelheit (Abb. 9A). Die Ethanol-Produktion stieg ebenfalls etwa eine halbe Stunde nach Einsetzen der Dunkelheit an. Für Reis-Pflanzen wurden am Ende der 8stündigen Nacht vergleichbar hohe Gärungsraten gemessen wie bei Anoxie in kontinuierlicher Dunkelheit (Abb. 9B). Erstaunlicherweise erreichte auch Weizen höhere

Gärungsraten als im Licht (Abb. 14D), und außerdem höhere Raten als in kontinuierlicher Dunkelheit (Abb. 9B). Nach Ende der Dunkel-Phase fiel zwar die Acetaldehyd-Produktion in beiden Pflanzen schnell wieder ab, die Ethanol-Ausscheidung blieb aber noch für mehrere Stunden auf hohem Niveau.

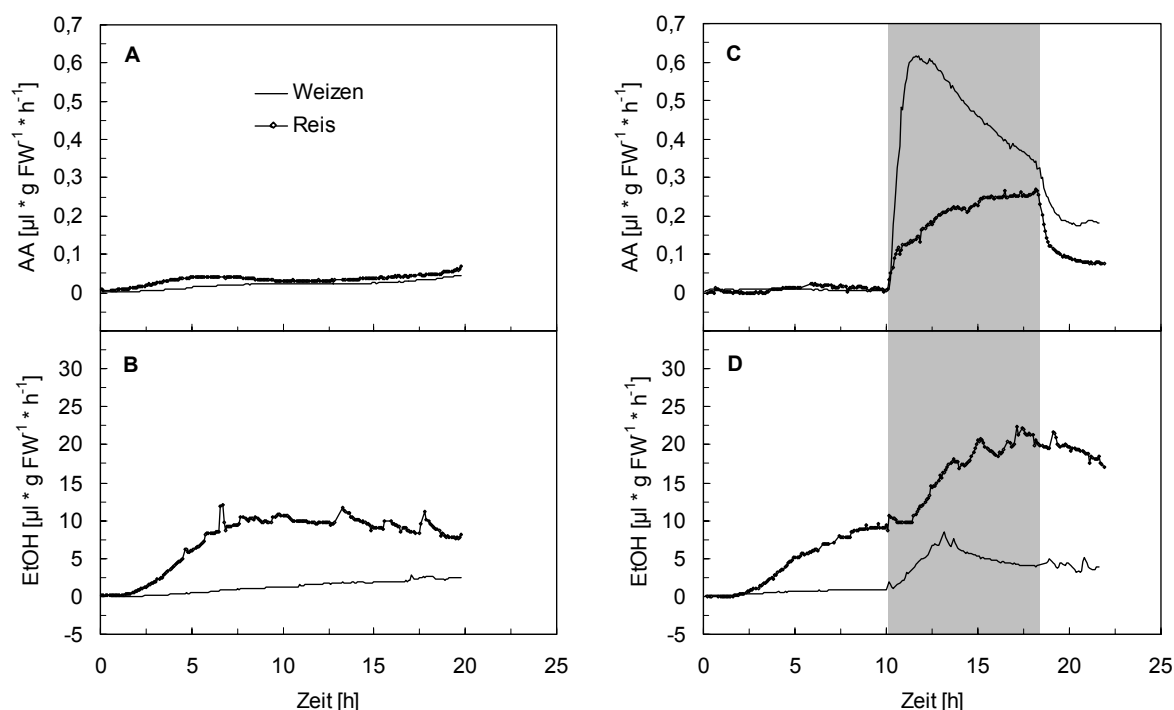


Abb. 14: Langzeit-Gärung in ganzen Pflanzen. Ethanol- und Acetaldehyd-Emission von ganzen Reis- (Linie mit Rhomben) und Weizen-Pflanzen (einfache Linie) während einer Anoxie-Periode wurden mit der photoakustischen Methode gemessen. A, B: Anoxie in kontinuierlichem Licht; C, D: Anoxie im Tag-Nacht-Rhythmus (8 h Nacht, grau hinterlegt). Eine repräsentative Kurve wurde aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählt.

3.1.2.3 Gärungsraten in Sprossen und Wurzeln während 4ständiger Anoxie

Neben den Experimenten mit ganzen Pflanzen sollte nun außerdem getestet werden, wie die beiden Organe Wurzel und Spross auf Beleuchtung reagierten. Während dieser Experimente war die Sauerstoffkonzentration auch in den beleuchteten Spross-Küvetten immer um 0% (Abb. 15). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Photosynthese nicht mehr normal funktionierte. Außerdem gab es im Stickstoffstrom keine messbare CO_2 -Aufnahme, sondern eine geringe CO_2 -Abgabe in den Sprossen (Tab. 6, Abb. 15). Diese war allerdings 50% niedriger als in Dunkelheit (Tab. 2). Die CO_2 -Abgabe war dabei nach 4 h Anoxie bei Weizen-Sprossen 6mal geringer als bei Reis-Sprossen. Wurzeln dagegen zeigten keine Unterschiede in der CO_2 -Produktion zwischen belichteter und unbelichteter Anoxie (Tab. 6 vs. Tab. 2).

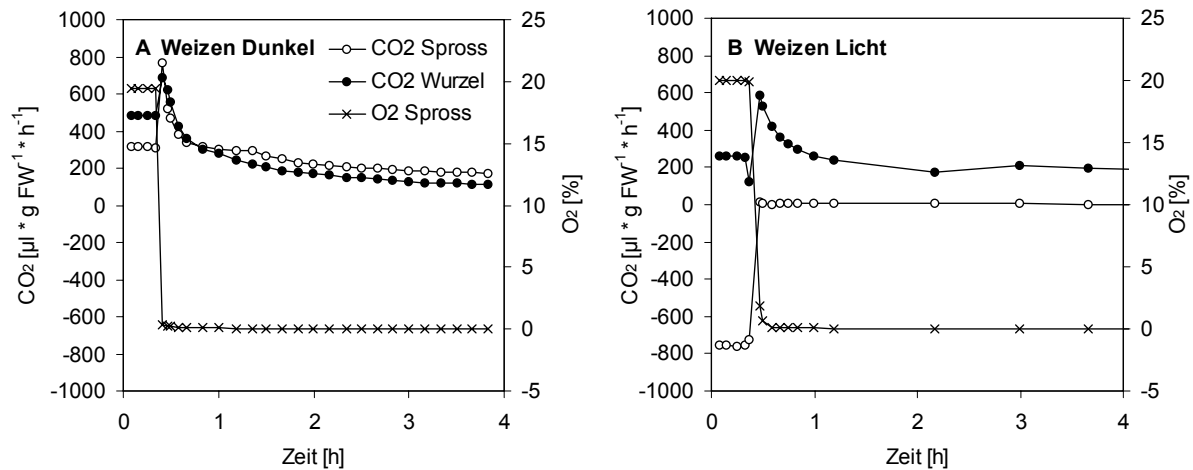


Abb. 15: Gaswechsel von CO_2 und O_2 in Wurzeln und Sprossen während einer Anoxie-Phase. Die Sauerstoffkonzentration in der Spross-Küvette (Kreuze) sowie der Austausch von CO_2 wurde an Wurzeln (schwarze Kreise) und Sprossen (weiße Kreise) von Weizen-Pflanzen während einer 4stündigen Anoxie-Phase während der Experimente mit dem photoakustischen Laser gemessen. Eine repräsentative Messung wurde aus 3 unabhängigen Experimenten ausgewählt.

Tab. 6: CO_2 -Produktion [μl * h⁻¹ * g⁻¹ FW] von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen sowie 2 und 4 h nach Beginn der Anoxie im Licht. Gezeigt werden die CO_2 -Ausscheidungsrate und die Pasteur-Quotienten ($\text{PQ} = 3 * \text{anaerobes CO}_2 / \text{aerobes CO}_2$) jeweils für Wurzeln und Sprosse. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 4 bis 5 Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		CO_2 [μl * h ⁻¹ * g ⁻¹ FW]		PQ [rel U]	CO_2 [μl * h ⁻¹ * g ⁻¹ FW]		PQ [rel U]
		Kontrolle	2 h Anoxie	2 h Anoxie	4 h Anoxie	4 h Anoxie	
Reis	Spross	-1269 \pm 272 ^c	79 \pm 41 ^d		100 \pm 60 ^d		
	Wurzel	182 \pm 35 ^a	264 \pm 43 ^a	4.76 \pm 1.84 ^A	255 \pm 48 ^a	4.66 \pm 2.02 ^A	
Weizen	Spross	-568 \pm 97 ^b	24 \pm 10 ^d		22 \pm 12 ^d		
	Wurzel	275 \pm 52 ^a	178 \pm 23 ^a	2.24 \pm 0.72 ^B	137 \pm 23 ^a	1.73 \pm 0.74 ^B	

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die anaerobe CO_2 -Produktion, und damit die Glycolyse, bei Belichtung besonders in den Sprossen gehemmt ist. Dies deckte sich mit den Daten der Ethanol- und Acetaldehyd-Produktion. Die Acetaldehyd-Ausscheidung der Sprosse im Licht betrug weniger als 10% der Rate in Dunkelheit (Abb. 16A, Abb. 10A). Die Acetaldehyd-Produktion der Wurzeln war dagegen weniger verändert (Abb. 16B). Auch die Ethanol-Produktion der beleuchteten Sprosse waren um 70% geringer als in Dunkelheit. Wiederum produzierten Reis-Sprosse 18mal mehr Ethanol als Weizen-Sprosse (Abb. 16C). Überraschenderweise war die Ethanol-Ausscheidung in Reis-Wurzeln unter belichteter Anoxie (Abb. 16D) doppelt so hoch wie in Dunkelheit (Abb. 10D), während sie in Weizen-Wurzeln gleich blieb.

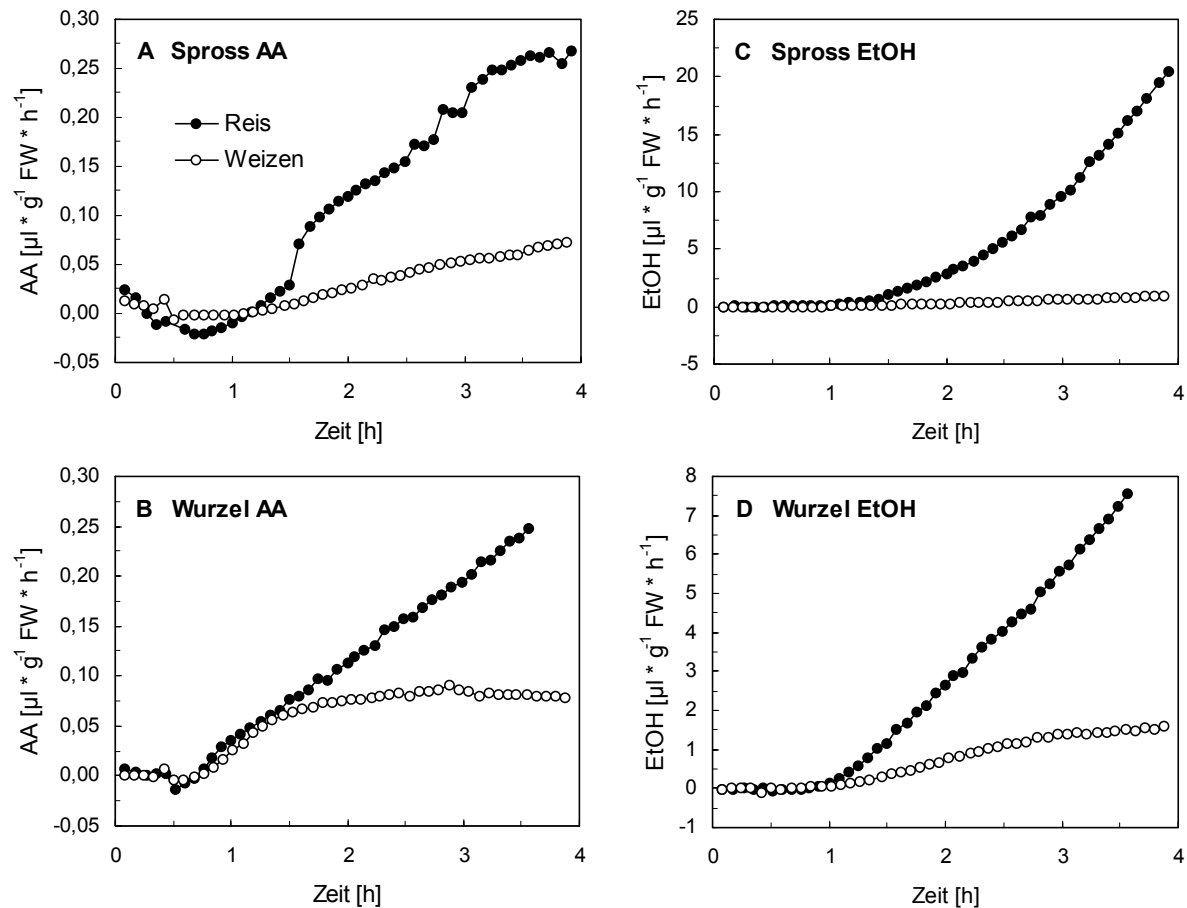


Abb. 16: Fermentation von Sprossen und Wurzeln während einer Anoxie-Phase im Licht. Photoakustische Messung der Ethanol- (C, D) und Acetaldehyd-Ausscheidung (A, B) von Sprossen (A, C) und Wurzeln (B, D) von Reis- (schwarze Kreise) und Weizen-Pflanzen (weiße Kreise) während 4stündiger Anoxie im Licht. Eine Zwei-Kompartimenten-Küvette wurde genutzt, um die Gärung von Sprossen und Wurzeln getrennt zu betrachten. Eine repräsentative Messung wurde aus 3 bis 6 unabhängigen Experimenten ausgewählt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

3.1.2.4 Aktivität der fermentativen Enzyme ADH und PDC

Wie schon in den Experimenten zur Dunkelheit erwähnt, waren die Aktivitäten der Gärungsenzyme ADH und PDC unter belüfteten Bedingungen in Wurzeln höher als in Sprossen, und in Reis-Sprossen höher als in Weizen-Sprossen (Tab. 7). 4 h Anoxie verursachten eine Erhöhung der ADH- und PDC-Aktivitäten in allen Geweben auf das 1,5 bis 3fache (Tab. 7), was in Dunkelheit nicht beobachtet werden konnte (Tab. 3). Der Anstieg der Aktivitäten war im Reis höher als im Weizen. Während 24 h Anoxie stiegen die Aktivitäten von ADH und PDC weiter an, und erreichten 5- bis 10fach höhere Werte als unter Belüftung. Im Endeffekt enthielten Reis-Sprosse 5- und 10fach höhere ADH- und PDC-Aktivitäten als Weizen-Sprosse, während in den Wurzeln keine deutlichen Unterschiede zwischen den Arten zu finden waren.

Tab. 7: Aktivitäten der Gärungsenzyme ADH und PDC [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) im Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 bis 10 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		ADH	PDC
		[$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	[$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
Reis			
Spross	0 h A	115 ± 17^a	2.84 ± 0.66^a
	4 h A	231 ± 22^b	10.83 ± 1.95^b
	24 h A	687 ± 102^c	24.77 ± 3.64^c
Wurzel	0 h A	279 ± 67^b	9.00 ± 2.29^b
	4 h A	930 ± 294^d	19.18 ± 2.00^c
	24 h A	988 ± 269^d	52.81 ± 9.94^d
Weizen			
Spross	0 h A	26 ± 7^e	0.59 ± 0.28^f
	4 h A	44 ± 6^e	1.08 ± 0.14^a
	24 h A	149 ± 23^a	2.50 ± 0.28^a
Wurzel	0 h A	435 ± 99^b	6.43 ± 1.82^b
	4 h A	622 ± 212^b	13.39 ± 2.22^b
	24 h A	1012 ± 195^d	35.53 ± 4.69^d

3.1.2.5 Kohlenhydrat-Abbau und Ethanol-Akkumulation in Sprossen und Wurzeln

Nach 4 h Anoxie fiel der Gehalt der Zucker in Wurzeln und Sprossen im Reis um 50% und im Weizen um 60% (Tab. 8). Während weiterer 20 h Anoxie verminderten sich die Zuckergehalte weiter, so dass nach 24 h Anoxie im Tag-Nacht-Rhythmus nur noch 20% bzw. 35% der löslichen Kohlenhydrate in Weizen- und Reis-Pflanzen vorhanden waren. Stärke wurde nur in den Sprossen abgebaut, wobei die abgebaute Menge in Reis- und Weizen-Pflanzen ähnlich hoch war (Tab. 8). Im Vergleich zur kompletten Dunkelheit (Tab. 4) war der anoxische Kohlenhydrat-Abbau unter Beleuchtung meist 10 bis 20% geringer.

Ethanol akkumulierte wiederum nicht im Wurzel-Gewebe, sondern nur im Spross. Nach 24 h Anoxie enthielten Reis-Sprosse 11 mal und Weizen-Sprosse 5 mal mehr Ethanol im Vergleich zur Belüftung (Tab. 8). Dabei war der Gehalt im Reis 40% höher als im Weizen.

Tab. 8: Gehalte an löslichen Zuckern, Stärke [mg * g FW⁻¹] und Ethanol [µg * g FW⁻¹] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) im Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Werte sind Mittelwerte ± SE von 6 bis 12 Proben aus 4 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		Glucose	Fructose	Saccharose	Stärke	Ethanol
		[mg * g FW ⁻¹]				[µg * g FW ⁻¹]
Reis						
Spross	0 h A	0.49 ± 0.04 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	7.27 ± 0.32 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	10 ± 1 ^a
	4 h A	0.26 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.02 ^b	3.74 ± 0.16 ^b	0.28 ± 0.03 ^b	42 ± 8 ^b
	24 h A	0.23 ± 0.03 ^b	0.19 ± 0.03 ^b	1.56 ± 0.15 ^d	0.19 ± 0.02 ^c	118 ± 17 ^c
Wurzel	0 h A	0.06 ± 0.02 ^c	0.17 ± 0.04 ^c	0.93 ± 0.09 ^d	0.14 ± 0.01 ^c	4 ± 2 ^d
	4 h A	0.03 ± 0.01 ^c	0.15 ± 0.04 ^c	0.43 ± 0.14 ^e	0.11 ± 0.03 ^c	4 ± 2 ^d
	24 h A	0.03 ± 0.01 ^c	0.06 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.04 ^e	0.14 ± 0.01 ^c	4 ± 1 ^d
Weizen						
Spross	0 h A	0.59 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.03 ^b	2.67 ± 0.16 ^c	0.71 ± 0.07 ^d	16 ± 2 ^a
	4 h A	0.36 ± 0.05 ^b	0.18 ± 0.02 ^c	0.95 ± 0.07 ^d	0.27 ± 0.03 ^b	41 ± 8 ^b
	24 h A	0.45 ± 0.07 ^{ab}	0.10 ± 0.02 ^c	0.80 ± 0.13 ^d	0.31 ± 0.05 ^b	84 ± 5 ^c
Wurzel	0 h A	0.18 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.04 ^b	0.74 ± 0.07 ^d	0.10 ± 0.01 ^c	14 ± 2 ^a
	4 h A	0.10 ± 0.02 ^d	0.12 ± 0.02 ^c	0.29 ± 0.08 ^e	0.09 ± 0.02 ^c	12 ± 2 ^a
	24 h A	0.03 ± 0.01 ^c	0.03 ± 0.01 ^d	0.15 ± 0.02 ^f	0.08 ± 0.02 ^c	12 ± 2 ^a

3.1.2.6 Energie-Haushalt und Überlebensraten nach Anoxie

Nach 24 h Anoxie in kompletter Dunkelheit zeigten Reis-Pflanzen deutliche Schäden an Blättern und Wurzeln, während Weizen-Pflanzen abgestorben waren (Abb. 11A, Abb. 12E). Beleuchtung dagegen verbesserte das Überleben beider Pflanzenarten während einer Anoxie-Periode. Während Reis-Pflanzen kaum Schäden nach 24 h Anoxie unter kontinuierlicher Beleuchtung oder im Tag-Nacht-Rhythmus zeigten, waren zumindest die oberen Blattteile der Weizen-Pflanzen unter diesen Bedingungen geschädigt (Abb. 11B, Abb. 12D). Die Wurzeln beider Pflanzenarten waren allerdings auch bei dieser Behandlung abgestorben, und während der Wiederbelüftungsphase bildeten sich neue, sprossbürtige Wurzeln.

Auch die ATP-Daten zeigten ein den Überlebensraten entsprechendes Bild. In Wurzeln fiel der ATP-Gehalt nach 4 h Anoxie im Licht auf 71% bzw. 56% bei Reis und Weizen. Nach 24 h Anoxie lag er nur noch bei 36% bzw. 16% der belüfteten Werte (Tab. 9). In den überlebenden Sprossen fiel der ATP-Gehalt nach 24 h Anoxie im Weizen auf 60% der belüfteten Kontrolle, und zeigte erstaunlicherweise keine deutlichen Veränderungen beim

Reis. Der AEC sank während der Anoxie-Phase in sensitiven Geweben, blieb aber im physiologischen Rahmen (Tab. 9).

Tab. 9: Gehalte an ATP und ADP [nmol * g FW⁻¹] sowie AEC [(ATP+0.5ADP)/ (ATP+ADP+AMP)] in Wurzeln und Sprossen von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (0 h A) sowie nach 4 und 24 h Anoxie (A) im Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 5 bis 10 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		ATP [nmol * g FW ⁻¹]	ADP [nmol * g FW ⁻¹]	AEC [rel U]
Reis				
Spross	0 h A	91.0 \pm 5.1 ^a	61.9 \pm 6.3 ^a	0.78 \pm 0.02 ^a
	4 h A	70.0 \pm 6.8 ^b	64.4 \pm 7.7 ^a	0.71 \pm 0.01 ^b
	24 h A	84.7 \pm 4.8 ^a	54.5 \pm 5.3 ^a	0.78 \pm 0.02 ^a
Wurzel	0 h A	39.5 \pm 2.1 ^c	23.6 \pm 2.1 ^b	0.79 \pm 0.02 ^a
	4 h A	28.1 \pm 5.5 ^c	11.3 \pm 1.3 ^c	0.82 \pm 0.03 ^a
	24 h A	14.4 \pm 1.4 ^d	14.3 \pm 2.1 ^c	0.66 \pm 0.04 ^b
Weizen				
Spross	0 h A	52.4 \pm 3.7 ^e	45.0 \pm 2.4 ^d	0.66 \pm 0.03 ^b
	4 h A	44.2 \pm 2.5 ^e	45.6 \pm 4.4 ^d	0.66 \pm 0.02 ^b
	24 h A	30.6 \pm 4.4 ^c	36.8 \pm 2.6 ^b	0.55 \pm 0.04 ^c
Wurzel	0 h A	44.2 \pm 2.3 ^c	21.9 \pm 1.9 ^b	0.80 \pm 0.03 ^a
	4 h A	24.8 \pm 3.4 ^d	13.1 \pm 1.1 ^c	0.79 \pm 0.02 ^a
	24 h A	7.3 \pm 1.1 ^e	5.1 \pm 0.8 ^c	0.61 \pm 0.04 ^b

3.1.2.7 Pigmentgehalte in Blättern nach 24stündiger Anoxie

Um die photosynthetischen Prozesse näher untersuchen zu können, wurde zunächst der Pigmentgehalt bei Belüftung und nach Anoxie gemessen. Nach 24 h Anoxie waren die Mengen an Chlorophyll a und b nicht signifikant verändert (Tab. 10). Es zeigten sich aber Veränderungen bei den Carotenoiden des Xanthophyll-Zyklus. Die Summe aller Xanthophylle war im Reis nach Anoxie 15% höher im Vergleich zur Kontrolle, dagegen unverändert im Weizen. Das Verhältnis der Xanthophylle veränderte sich aber bei beiden Pflanzenarten drastisch. Während die Menge an Violaxanthin unter Anoxie stark abnahm, stieg der Zeaxanthin-Gehalt um das 17fache an. Daraus folgt, dass sich der DEPS während der Anoxie stark erhöhte (Tab. 10).

Tab. 10: Gehalte an Photosynthese-Pigmenten [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$], Chlorophyll a/b-Verhältnis und DEPS ((Z+0.5A)/VAZ) in Blättern von Reis- und Weizen-Pflanzen unter aeroben Bedingungen (C) sowie nach 1 d Anoxie (A) im Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 Proben. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Werte mit dem gleichen Buchstaben in einer Spalte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

	Chloro- phyll a [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$]	Chloro- phyll b [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$]	Chl a/b [rel U]	Viola- xanthin	Anthera- xanthin [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$]	Zea- xanthin	DEPS [rel U]
Reis							
C	924 ± 136^a	325 ± 52^a	2.88 ± 0.07^a	55.92 ± 9.69^a	3.42 ± 0.14^a	2.02 ± 0.25^a	0.07 ± 0.01^a
1d A	942 ± 76^a	327 ± 23^a	2.88 ± 0.09^a	5.14 ± 1.45^b	2.56 ± 1.30^a	59.18 ± 5.39^b	0.90 ± 0.03^b
Weizen							
C	1028 ± 39^a	380 ± 21^a	2.72 ± 0.11^a	51.63 ± 2.91^a	3.62 ± 0.72^a	1.50 ± 0.75^a	0.05 ± 0.02^a
1d A	878 ± 64^a	333 ± 43^a	2.72 ± 0.15^a	9.20 ± 0.67^b	3.90 ± 1.59^a	39.88 ± 5.88^c	0.79 ± 0.01^c

3.1.2.8 Photosynthetischer Gaswechsel nach Anoxie

Während der Anoxie-Periode im Licht konnten weder photosynthetische CO_2 -Aufnahme noch O_2 -Abgabe gemessen werden (Abb. 15B für Weizen). Deswegen wurde zunächst die Fähigkeit der Pflanzen untersucht, nach Anoxie Photosynthese betreiben zu können. Allgemein waren die Photosynthese-Rate, bezogen auf das Frischgewicht, im Reis höher als im Weizen (Tab. 6), aber, bezogen auf die Fläche, geringer im Reis als im Weizen, (Abb. 17). Die im Folgenden gezeigten Versuche beziehen sich auf die Fläche.

4 h Anoxie verursachten einen Abfall der maximalen Photosyntheserate ($J_{\text{CO}_2\text{max}}$) sowohl bei Reis als auch bei Weizen, während der Abfall im Reis stärker als im Weizen ausfiel (Abb. 17A). Längere Anoxie-Behandlung verursachte keinen weiteren Rückgang von $J_{\text{CO}_2\text{max}}$ im Reis, aber eine Verminderung auf nahe 0 im Weizen. Die apparente Quantenausbeute ($\Phi_{\text{CO}_2\text{app}}$) verhielt sich im Reis ebenfalls stabiler als im Weizen (Abb. 17B). Wiederbelüftung ermöglichte es Reis-Blättern, $\Phi_{\text{CO}_2\text{app}}$ wieder zu steigern, während Weizen-Blätter dazu nicht in der Lage waren. Im Gegensatz zur Photosynthese veränderte sich die Dunkelatmung beider Pflanzen nach Anoxie nicht signifikant (Abb. 17C).

3.1.2.9 Chlorophyll-Fluoreszenz nach Anoxie und Wiederbelüftung

Neben den Gaswechsel-Messungen wurden außerdem Chlorophyll-Fluoreszenz-Parameter der Blätter nach Anoxie-Behandlung erhoben. Diese Werte geben Aufschluss über die photochemischen Prozesse, insbesondere über die Aktivität von PSII. Die Quanten-Effizienz der offenen PSII-Zentren (Φ_{max}) fiel nach Anoxie ab, dabei war der sensitive Weizen mehr

betroffen als der tolerante Reis (Abb. 18A). Die aktuelle Elektronentransport-Rate (ETR) reagierte empfindlicher auf Anoxie, zeigte aber die gleiche Tendenz wie Φ_{\max} (Abb. 18B). Während der Wiederbelüftung erlangten beide Parameter nur im Reis nahezu das Ausgangsniveau, während Weizen kaum noch die Fähigkeit zu photochemischer Aktivität zeigte.

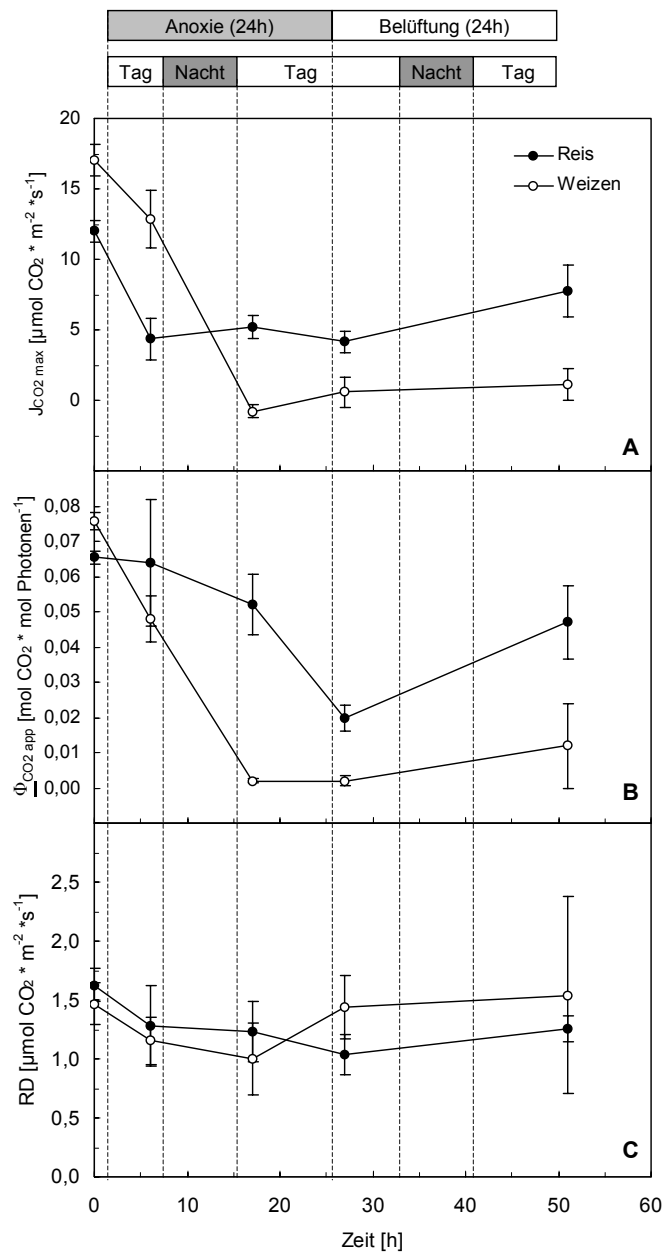


Abb. 17: Photosynthetischer Gaswechsel in Blättern nach Anoxie. Die maximale CO_2 -Aufnahmerate ($J_{\text{CO}_2\text{max}}$), die maximale apparente Quantenausbeute der CO_2 -Aufnahme ($\Phi_{\text{CO}_2\text{app}}$) und die mitochondriale Atmung in Dunkelheit (R_D) wurden in Luft, direkt nach dem Ende unterschiedlich langer Anoxie-Phasen oder nach 24 h Wiederbelüftung gemessen. Untersucht wurden Blätter von Reis- (schwarze Kreise) und Weizen-Pflanzen (weiße Kreise) im Tag-Nacht-Rhythmus. Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von 4 bis 8 Messungen aus 3 unabhängigen Anzuchten.

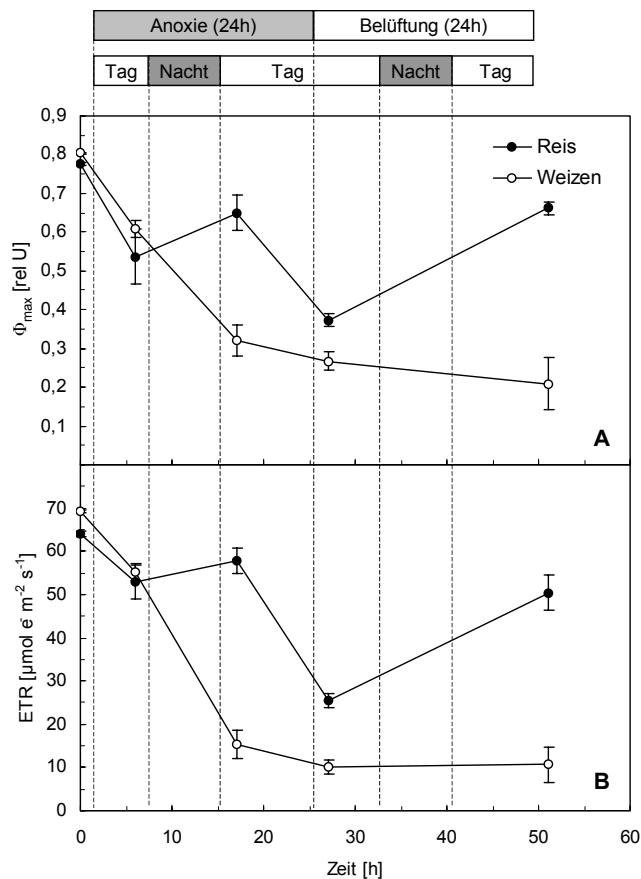


Abb. 18: Fluoreszenz in Blättern nach Anoxie. Die maximale Quanten-Ausbeute des PSII ($F_v/F_m = \Phi_{\max}$) sowie die apparente Elektronentransport-Rate (ETR) wurden in Luft, direkt nach dem Ende unterschiedlich langer Anoxie-Phasen oder nach 24 h Wiederbelüftung gemessen. Untersucht wurden Blätter von Reis- (schwarze Kreise) und Weizen-Pflanzen (weiße Kreise) im Tag-Nacht-Rhythmus. Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von 10 bis 20 Messungen aus 3 unabhängigen Anzuchten.

3.1.2.10 Fluoreszenz-Analyse während der Anoxie und der Einfluss von CO_2 -Zugabe

Das Fehlen einer Sauerstoff-Freisetzung bei belichteter Anoxie könnte darauf beruhen, dass der gesamte, während der Photosynthese produzierte Sauerstoff durch die mitochondriale Atmung innerhalb der Pflanze verbraucht wird. Es kann aber auch dadurch verursacht werden, dass keine Photosynthese stattfindet. Deswegen wurden bei den Pflanzen direkt während der Anoxie-Periode zwei Fluoreszenz-Parameter bestimmt, um herauszufinden, inwieweit Elektronentransport zwischen PSII und PSI unter Anoxie betrieben wird.

Während der 6stündigen Untersuchung unter Anoxie zeigte die maximale Quantenausbeute des PSII (Φ_{\max}) nur eine geringe Verminderung im Reis und Weizen. Nach 6 h Anoxie erreichten die Werte 85% der belüfteten Kontrolle (Abb. 19A, C). Dagegen fiel die apparente ETR schon nach 30 min Anoxie auf 15% der belüfteten Werte in beiden Pflanzen-Arten (Abb. 19B, D). Dabei war der Abfall bei Weizen geringer als bei Reis. Diese Verlangsamung des

Elektronentransportes verursachte einen Elektronen-Rückstau, der sich in dem hohen De-Epoxidations-Status der Blätter unter Anoxie zeigte (Tab. 10).

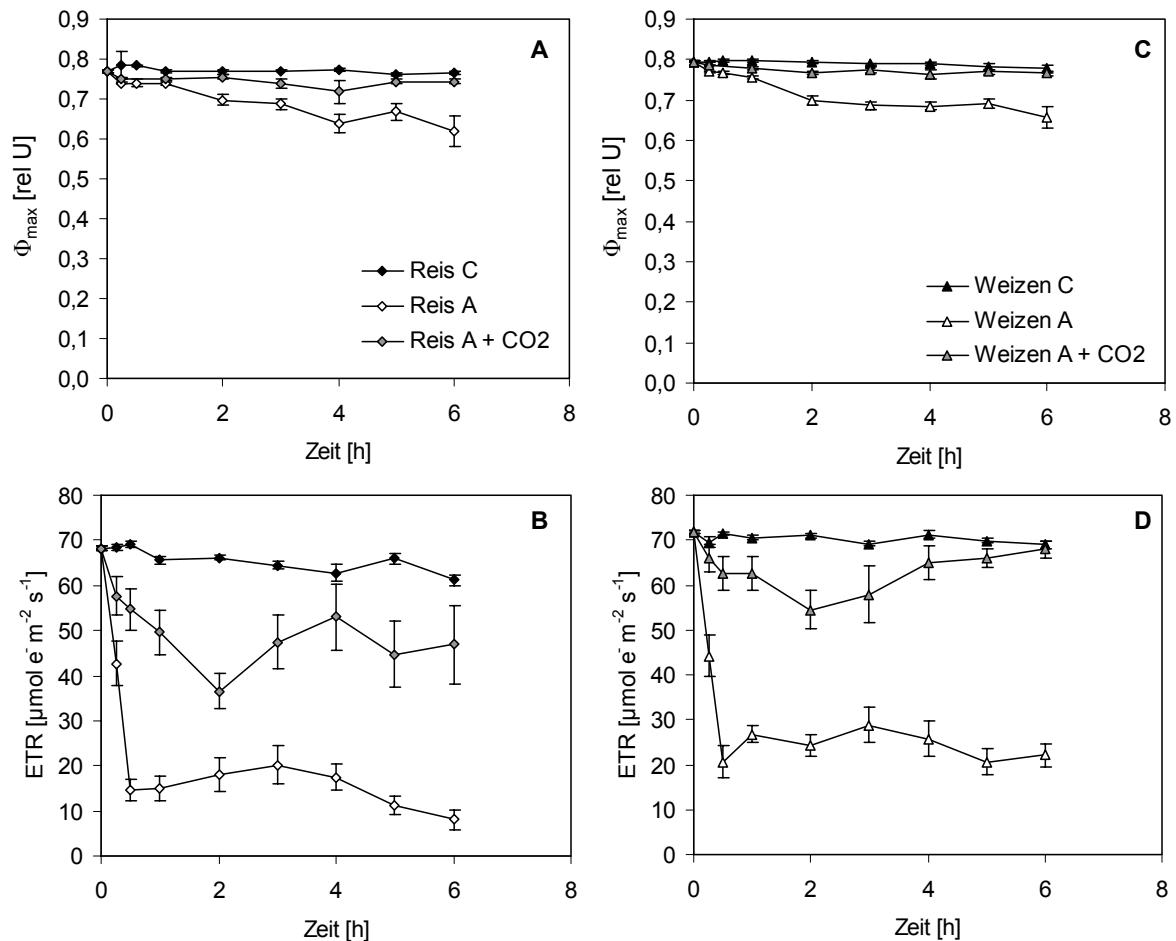


Abb. 19: Fluoreszenz in Blättern während einer Anoxie-Phase. Die maximale Quanten-Ausbeute des PSII ($F_v/F_m = \Phi_{\max}$; A, C) sowie die apparente Elektronentransport-Rate (ETR; B, D) wurden direkt an Blättern von Reis- (A, B) und Weizen-Pflanzen (C, D) im Licht in Stickstoff-Atmosphäre (weiße Symbole) oder in Luft (schwarze Symbole) gemessen. Einem Teil der Pflanzen wurde CO₂ in Form von HCO₃⁻ zugegeben (graue Symbole). Die Werte sind Mittelwerte \pm SE von 10 bis 20 Messungen aus 3 unabhängigen Anzuchten.

Nun ergab sich die Frage, was die Ursache für den Elektronen-Rückstau und damit die Hemmung der photosynthetischen Prozesse unter Anoxie war. Vorstellbar ist, dass in der reinen Stickstoff-Atmosphäre ein CO₂-Mangel in den Pflanzen auftrat, der die Photosynthese hemmte. Um diese Annahme zu testen, wurde zu einem Teil der Pflanzen eine gepufferte Mischung von NaHCO₃/KHCO₃ als CO₂-Quelle zur Nährlösung gegeben. Diese Behandlung veränderte die Werte der belüfteten Kontrolle nicht. Während einer Anoxie-Periode fiel die ETR trotz HCO₃⁻-Zugabe im Vergleich zur Kontrolle ab, wenn auch geringer als in reiner Stickstoff-Atmosphäre (Abb. 19B, D). Auch Φ_{\max} fiel langsamer ab als ohne HCO₃⁻-Zugabe.

Dies lässt darauf schließen, dass zumindest teilweise ein Fehlen von CO₂ für eine Hemmung der Photosynthese unter Anoxie sorgt. Wiederum zeigte aber Reis einen stärkeren Abfall des Elektronentransportes als im Weizen (Abb. 19B, D).

3.1.3 Weitere Untersuchungen zum Gärungsstoffwechsel

3.1.3.1 Acetaldehyd- und Ethanol-Abgabe während einer Wiederbelüftungsphase

Neben der Untersuchung der Gärung von Reis- und Weizenpflanzen während der Anoxie wurden mit dem photoakustischen Laser-System außerdem Messungen während einer Wiederbelüftungsphase durchgeführt. Nach 4 h Stickstoff-Begasung wurden die Pflanzen wieder einem Luftstrom ausgesetzt, und die Ausscheidung von Ethanol und Acetaldehyd detektiert (Abb. 20). Das Gärungsverhalten während der Anoxie-Periode war vergleichbar mit dem der schon gezeigten Experimente.

Wiederbelüftung verursachte einen plötzlichen starken Anstieg der Acetaldehyd-Produktion in Reis- und Weizen-Pflanzen unter Dunkelheit (Abb. 20A, C). Im Vergleich zum Reis war dieser in Weizen-Pflanzen höher und länger andauernd. Die Ethanol-Ausscheidung zeigte bei nachlassender Acetaldehyd-Produktion einen erneuten Anstieg nach etwa 1 bis 2 h Wiederbelüftung.

Tab. 11: Gesamtmenge an ausgeschiedenem Acetaldehyd und Ethanol [$\mu\text{l} \cdot \text{g FW}^{-1}$] von Reis- und Weizen-Pflanzen während 4stündiger Anoxie oder einer 4stündigen Wiederbelüftungsphase in Dunkelheit und im Licht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE aus 4 unabhängigen Experimenten. Werte in einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

		Acetaldehyd	Ethanol
		[$\mu\text{l} \cdot \text{g FW}^{-1}$]	
Reis			
Anoxie	Dunkel	2.44 ± 0.49^a	43.34 ± 4.01^a
	Licht	0.04 ± 0.01^c	2.83 ± 0.16^e
Wiederbelüftung	Dunkel	5.81 ± 1.09^b	98.19 ± 7.84^b
	Licht	0.91 ± 0.07^a	15.15 ± 0.84^c
Weizen			
Anoxie	Dunkel	1.70 ± 0.44^a	5.25 ± 0.77^d
	Licht	0.02 ± 0.01^c	0.72 ± 0.07^g
Wiederbelüftung	Dunkel	7.84 ± 2.26^b	7.07 ± 1.62^d
	Licht	0.03 ± 0.02^c	1.67 ± 0.20^f

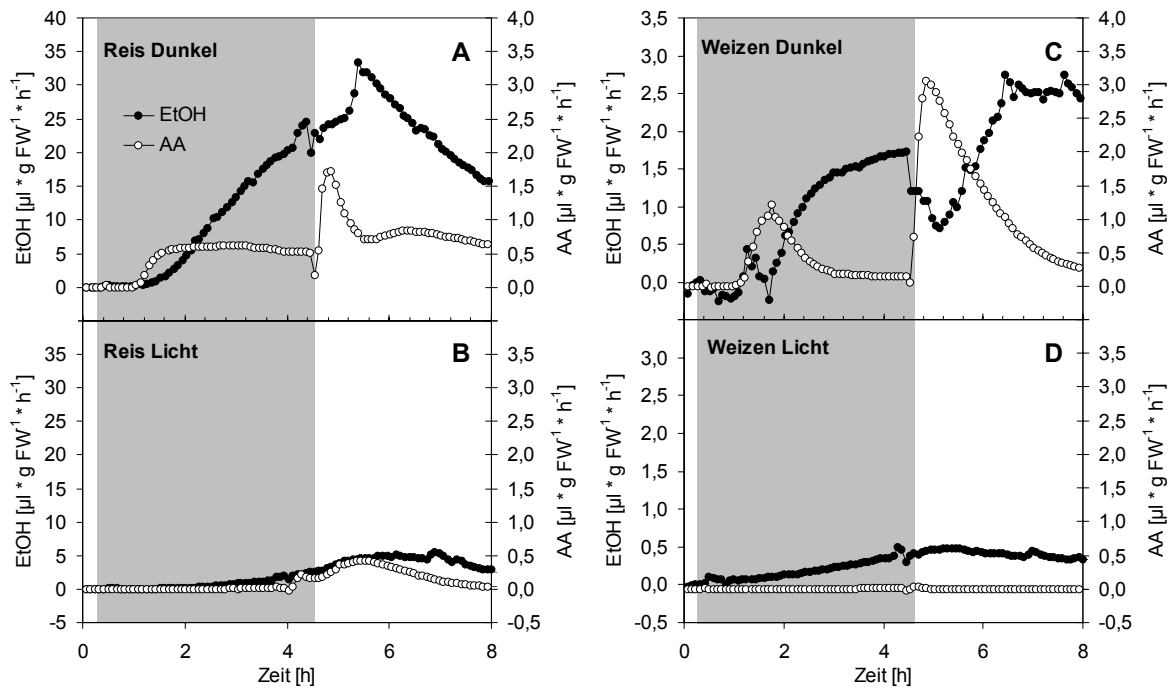


Abb. 20: Gärung unter Anoxie und bei Wiederbelüftung in ganzen Pflanzen. Photoakustische Messung der Ethanol- (schwarze Kreise) und Acetaldehyd-Ausscheidung (weiße Kreise) von Reis- (A, B) und Weizen-Pflanzen (C, D) während 4stündiger Anoxie (grauer Hintergrund) und einer 4stündigen Wiederbelüftungsphase (weißer Hintergrund) in Dunkelheit (A, C) und im Licht (B, D). Eine repräsentative Messung wurde aus 4 unabhängigen Experimenten ausgewählt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

Belichtung führte zu einer deutlichen Verringerung der anoxischen und post-anoxischen Acetaldehyd-Produktion, und verminderte erneut die Ethanol-Bildung in beiden Pflanzen-Arten (Abb. 20B, D). So war die anoxisch produzierte Acetaldehyd-Menge im Reis in Dunkelheit 60mal höher als bei Belichtung, beim Weizen 80mal höher (Tab. 11). Während der Wiederbelüftung waren die Werte in Dunkelheit 6fach bzw. 240fach höher. Bei der Ethanol-Ausscheidung in diesem Experiment waren die Unterschiede zwischen Licht und Dunkelheit nicht so stark ausgeprägt wie beim Acetaldehyd, und ergaben bei Anoxie 15- und 7-fach bzw. bei Wiederbelüftung 6- und 4-fach höhere Werte in Dunkelheit für Reis und Weizen (Tab. 11).

Wurde dieses Experiment in einer Zwei-Kompartimenten-Küvette wiederholt, ergab sich, dass der größte Teil der post-anoxischen Acetaldehyd-Produktion wiederum auf den Spross zurückzuführen war (Abb. 21). Während in Reis- und Weizen-Sprossen ein großer Peak der Acetaldehyd-Produktion nach Wiederbelüftung auftrat (Abb. 21A, C), zeigten nur Reis-Wurzeln, nicht aber Weizen-Wurzeln einen sehr kurz andauernden Peak direkt nach Wiederbelüftung. Auch die Ethanol-Ausscheidung in der post-anoxischen Phase zeigte nur in

Sprossen einen erneuten Anstieg, in Wurzeln dagegen fiel die Ethanol-Bildung gleichmäßig ab. Die Unterschiede zwischen Wurzeln und Sprossen beruhten höchstwahrscheinlich darauf, dass Sprosse mehr Ethanol speicherten (Tab. 4, Tab. 8).

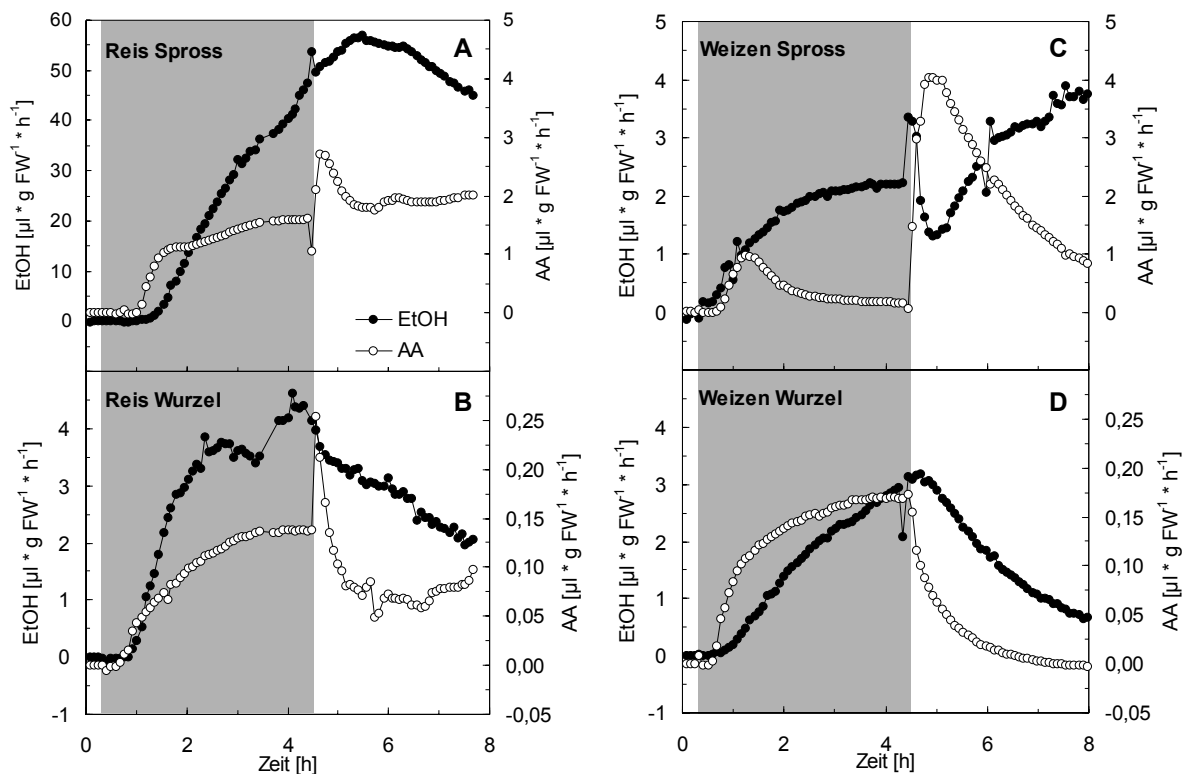


Abb. 21: Gärung unter Anoxie und nach Wiederbelüftung. Photoakustische Messung der Ethanol- (schwarze Kreise) und Acetaldehyd-Ausscheidung (weiße Kreise) von Sprossen (A, C) und Wurzeln (B, D) von Reis- (A, B) und Weizen-Pflanzen (C, D) während 4stündiger Anoxie (grauer Hintergrund) und einer 4stündigen Wiederbelüftungsphase (weißer Hintergrund) in Dunkelheit. Eine Zwei-Kompartimenten-Küvette wurde genutzt, um die Gärung von Sprossen und Wurzeln getrennt zu betrachten. Eine repräsentative Messung wurde aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten ausgewählt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

Außerdem wurde untersucht, wie sich die post-anoxische Acetaldehyd-Produktion nach unterschiedlichen Zeiten der vorangegangenen Anoxie verhielt. Nach 2 h Anoxie schieden sowohl Weizen- als auch Reis-Pflanzen bei Wiederbelüftung viel geringere Mengen an Acetaldehyd aus als nach 4 h Anoxie (Abb. 22A, B, D, E). Nach längerer Anoxie-Dauer unterschied sich die post-anoxische Acetaldehyd-Produktion in beiden Arten deutlich. Während Reis-Pflanzen nach 28 h Anoxie eine mindestens 3mal höhere Acetaldehyd-Ausscheidung zeigten als nach 4 h (Abb. 22C), war die ausgeschiedene Menge Acetaldehyd im Weizen nach 30 h Anoxie viel geringer als nach 4 h Anoxie (Abb. 22F).

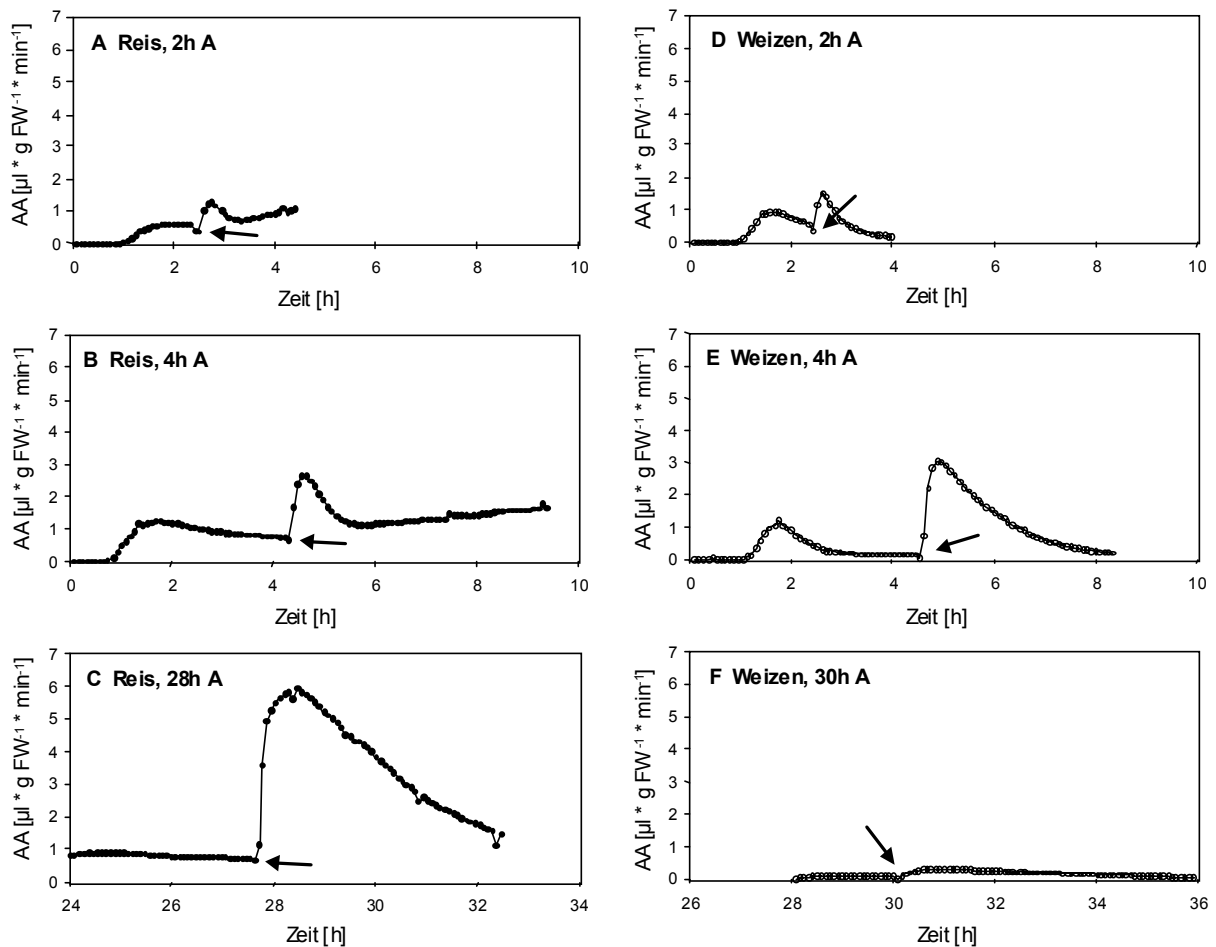


Abb. 22: Acetaldehyd-Produktion bei Wiederbelüftung nach verschiedenen Zeiten der Anoxie. Photoakustische Messung der Acetaldehyd-Ausscheidung von Reis- (A-C) und Weizen-Pflanzen (D-F) während unterschiedlicher Zeiten der Anoxie (A) und einer Wiederbelüftungsphase (Beginn durch Pfeil markiert) in Dunkelheit. Eine repräsentative Messung wurde aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten ausgewählt.

3.1.3.2 Fermentationsraten unter Hypoxie-Bedingungen

In der Natur tritt Überflutung hauptsächlich im Wurzelbereich auf. Die Anpassungsfähigkeit dieser Organe ist daher auch wichtig für das Überleben der Pflanzen unter Hypoxie-Bedingungen. Hier spielt, wie schon erwähnt, die Ausbildung eines Aerenchyms eine wichtige Rolle. Ausgedehnte Interzellulare ermöglichen es, Luft zu transportieren, und so einen Sauerstoffmangel zu vermeiden (Armstrong 1979). Es ist denkbar, dass durch diese Transportvorgänge Gärungsprozesse in den Wurzeln vermieden werden können. Dies wurde im folgenden Experiment untersucht.

Pflanzen wurden in einer Zwei-Kompartimenten-Küvette für die Analyse durch den photoakustischen Laser so behandelt, dass nur der Wurzelraum mit Stickstoff begast wurde,

während die Spross-Küvette mit Luft begast wurde. Dabei wurde in Sprossen beider Pflanzen keine Ethanol-Bildung beobachtet, während zusätzliche Begasung des Sprossbereiches mit Stickstoff die schon bekannte Ethanol-Produktion hervorrief (Abb. 23A, C). Erstaunlicherweise zeigten stickstoffbegaste Reis-Wurzeln keine Ethanol-Bildung, wenn deren Sprosse mit Luft begast wurden (Abb. 23B). Weizen-Wurzeln dagegen wiesen vergleichbare Gärungsraten unter Hypoxie- und Anoxie-Bedingungen auf (Abb. 23D).

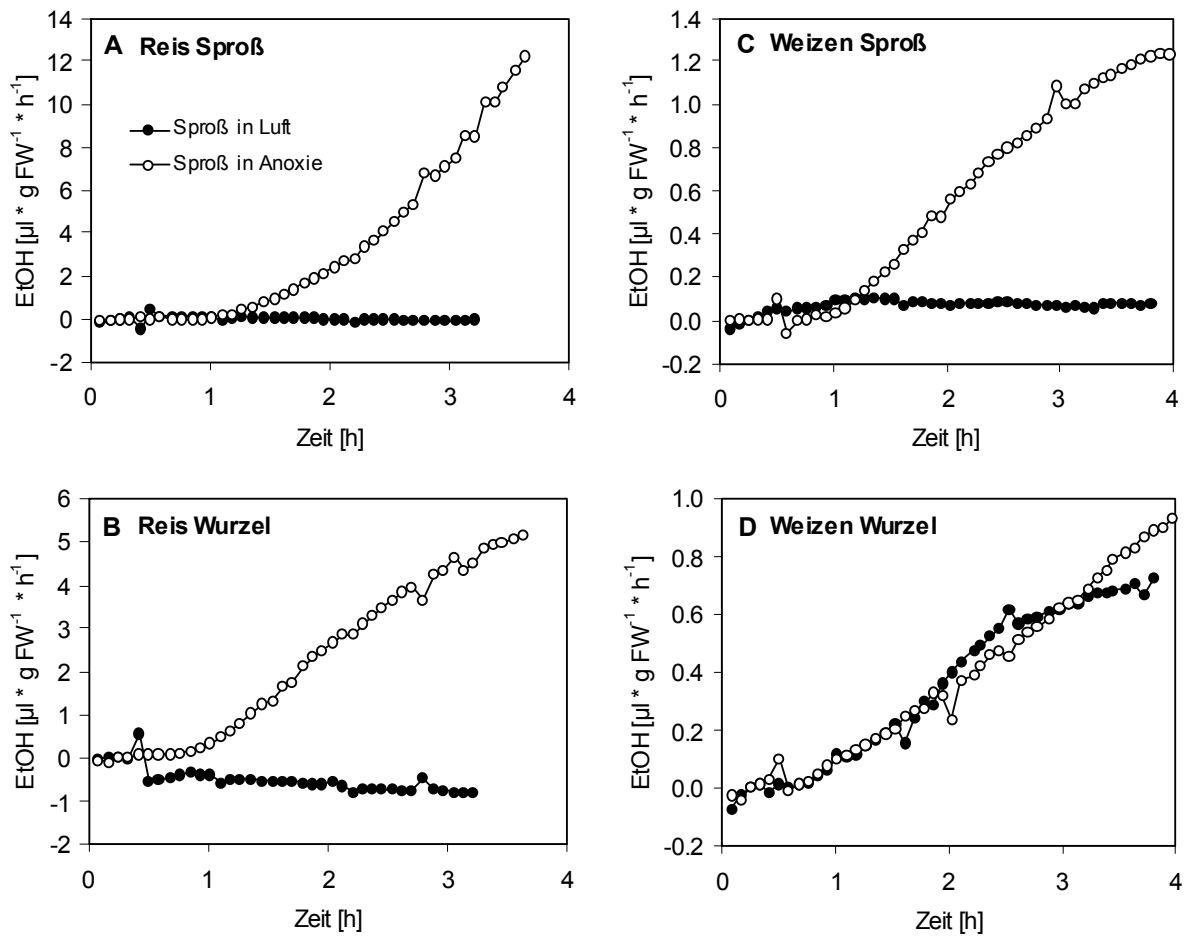


Abb. 23: Fermentation unter Hypoxie- und Anoxie-Bedingungen. Photoakustische Messung der Ethanol-Ausscheidung von Sprossen (A, C) und Wurzeln (B, D) von Reis- (A, B)- und Weizen-Pflanzen (C, D) im Licht. Bei Variante 1 (schwarze Kreise) befand sich der Spross jeweils in Luft, während die Wurzeln mit Stickstoff begast wurden, bei Variante zwei (weiße Kreise) wurde die ganze Pflanze mit Stickstoff begast. Eine Zwei-Kompartimenten-Küvette wurde genutzt, um die Gärung von Sprossen und Wurzeln getrennt zu betrachten. Eine repräsentative Messung wurde aus 2 bis 4 unabhängigen Experimenten ausgewählt.

3.1.3.3 Etablierung eines Systems zur einfachen Bestimmung der Fermentationsraten von Wurzeln

Das oben beschriebene laser-basierte Messsystem ist zeitlich und materiell sehr aufwendig, und war nur in Nijmegen/ Holland durchführbar. Um für die im folgenden beschriebenen Kartoffel-Pflanzen ebenfalls anaerobe Glycolyse-Rate bestimmen zu können, wurde ein einfacheres System etabliert. Abgeschnittene Wurzeln von Pflanzen, die entweder unter Hypoxie oder Belüftung gewachsen waren, wurden in ein abgeschlossenes Gefäß gegeben, welches anschließend mit Stickstoff-begastem Wasser vollständig gefüllt und dann verschlossen wurde. Für unterschiedlich lange Zeiten wurden diese Gefäße bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, und danach Wurzeln und Lösung bis zur weiteren Analyse getrennt aufbewahrt. Anschließend wurde der in die Lösung ausgeschiedene Ethanol sowie der in den Wurzeln vorhandene Ethanol gemessen.

Zunächst wurde das System an belüfteten und hypoxisch behandelten Weizen-Wurzeln getestet. Für die ersten 6 h war in der Inkubationslösung eine nahezu lineare Produktion von Ethanol zu beobachten (Abb. 24B). Dabei wurde nahezu der gesamte Ethanol ausgeschieden, während die Wurzeln kaum Ethanol akkumulierten (Abb. 24A). Wurzeln, die 4 Tage in Hypoxie gewachsen waren, schieden 3mal mehr Ethanol aus als belüftete Wurzeln (Abb. 24B). Lactat-Bildung war nur für die erste Stunde der Anoxie messbar (Abb. 24C, D). Die Ethanol-Bildung korrelierte mit einem Verbrauch an löslichen Zuckern (Abb. 24E). Zugabe von 100 mM Glucose zur anaeroben Inkubationslösung steigerte die Ethanol-Produktion von hypoxisch vorbehandelten Wurzeln oder belüfteten Wurzeln um 50 bis 60% (Abb. 24F).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Wurzeln bei länger andauernder Anoxie hauptsächlich Ethanol produzieren, der nahezu vollständig an das umgebende Medium abgegeben wird. Demzufolge wurde in den später beschriebenen Versuchen an Kartoffeln nur die von den Wurzeln in die Lösung ausgeschiedene Menge an Ethanol bestimmt, um einen relativ guten Wert für die anaerobe Glycolyse-Rate zu erhalten. Die Wirksamkeit des Systems in Kartoffel-Wurzeln wurde 8 h lang untersucht, und ergab ähnliche Werte wie die Weizen-Wurzeln (Abb. 25).

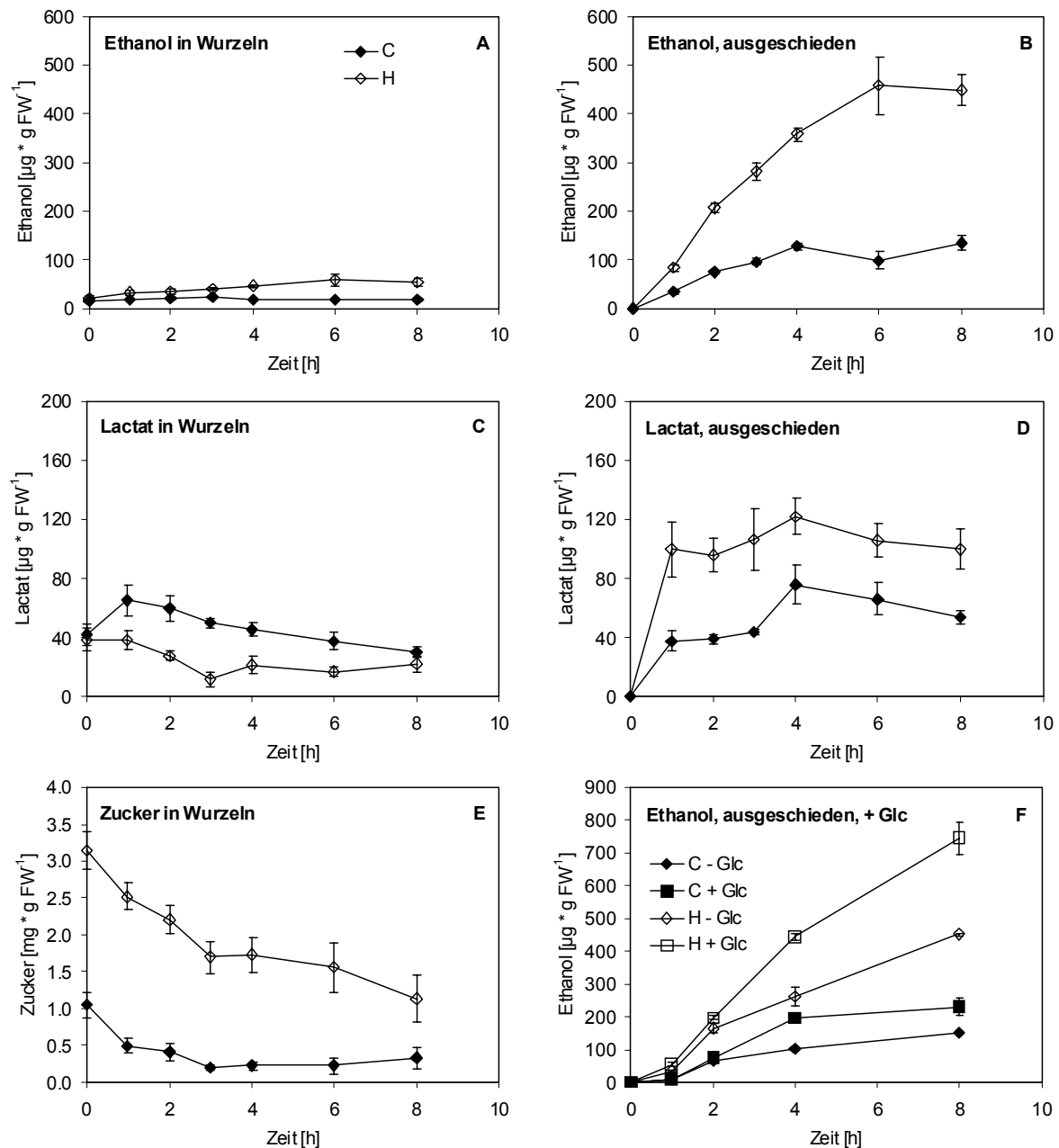


Abb. 24: Gärungs-Raten und Zucker-Gehalte in abgeschnittenen Wurzeln von Weizen-Pflanzen nach 4 Tagen Hypoxie (weiße Symbole) im Vergleich zur belüfteten Kontrolle (schwarze Symbole). Die Ethanol- und Lactat-Produktion wurde in einem abgeschlossenen anaeroben System gemessen. Jeweils wurden der Ethanol- (A, B) und Lactat-Gehalt (C, D) in der Inkubations-Lösung sowie in Wurzelextrakten enzymatisch bestimmt. Außerdem werden die Zuckergehalte (Glc+Fru+Suc) in den Wurzeln gezeigt (E). F: Wiederholung des Inkubations-Experimentes mit Zugabe von 100 mM Glucose in die anaerobe Lösung (+ Glc). Dargestellt sind hierbei nur die ausgeschiedenen Ethanol-Mengen. Werte sind Mittelwerte \pm SE von 5 bis 12 Proben (A-E) bzw. 3 Proben (F).

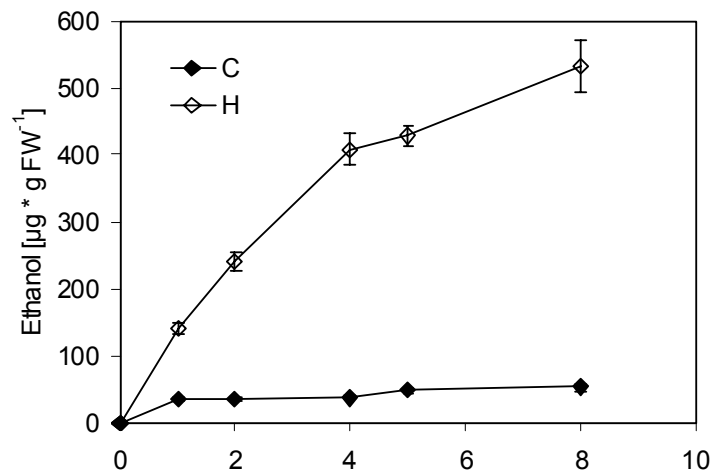


Abb. 25: Gärungs-Raten abgeschnittener Wurzeln von Kartoffel-Pflanzen (Desiree WT) nach 4 Tagen Hypoxie (H) im Vergleich zur belüfteten Kontrolle (C) in einem abgeschlossenen anaeroben System. Der Ethanol-Gehalt in der Inkubations-Lösung wurde enzymatisch bestimmt. Werte sind Mittelwerte \pm SE von 9 Proben.

3.2 Hat PPi eine Bedeutung unter Sauerstoffmangel?

3.2.1 Auswirkung von PPi-Mangel auf Reaktionen von Kartoffel-Pflanzen unter Hypoxie

3.2.1.1 Grundlegende Beschreibung und Phänotyp der UPPaII-2-Pflanzen

Um herauszufinden, welche Bedeutung PPi für die Reaktionen von Pflanzen unter Hypoxie-Bedingungen hat, wurden transgene Kartoffel-Pflanzen mit einem verminderten PPi-Gehalt untersucht. Dies wurde durch die Expression einer cytosolischen PPase von *E. coli* unter der Kontrolle des chimären Promotors STLS/ 35S-CaMV erreicht (Abb. 26A, Hajirezaei und Sonnewald 1999). Für die folgenden Experimente wurde die Linie UPPa II-2 genutzt.

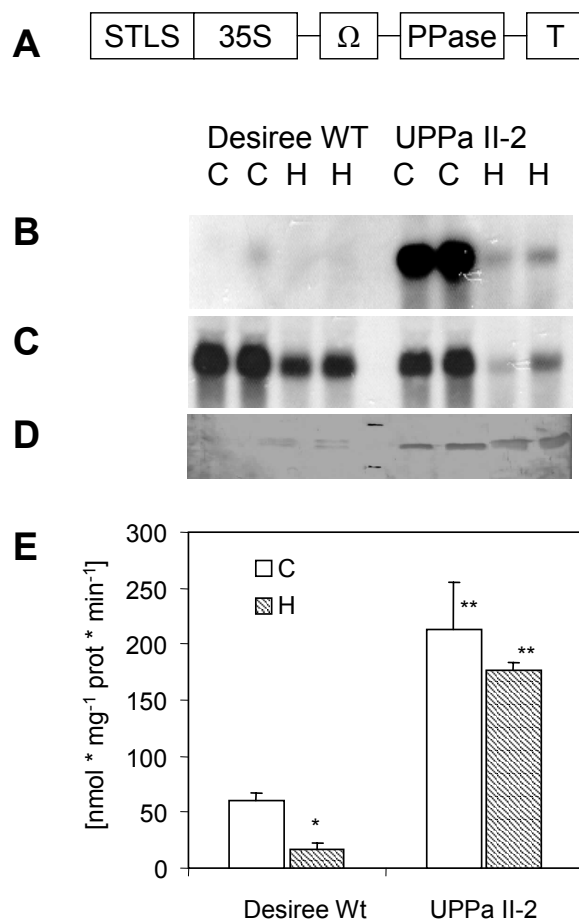


Abb. 26: Expression der *E. coli*-PPase in Wurzeln von transgenen Kartoffel-Pflanzen (cv. Desiree). A: Schematische Struktur des Konstruktes für die Pflanzentransformation. STLS, Blatt- und Stengel-spezifischer Promotor; 35S, 35S-CaMV-Promotor; Ω, TMV-U1 Translations-Enhancer; T, Octopin-Synthase-Terminator. B, C: Northern-Blot-Analyse der *E. coli*-PPase (B) sowie der kartoffeleigenen PPase (C) in Wurzelspitzen der UPPa II-2-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Desiree WT) unter belüfteten Bedingungen [C] und nach 4 Tagen Hypoxie [H] mit jeweils zwei Proben. D, E: Western-Blot der *E. coli*-PPase (D) sowie Enzymaktivität der löslichen PPase (E) in Kartoffel-Wurzeln nach 4 Tagen Hypoxie [H] im Vergleich zur belüfteten Kontrolle [C]. Aktivitäts-Werte sind Mittelwerte \pm SE von 8 bis 12 Proben aus 4 unabhängigen Anzuchten. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (*) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (**) bei $\alpha < 0.05$ (T-Test).

Da die früheren Daten nur an Kartoffel-Knollen erhoben worden waren, wurde nun zunächst die Expression der *E. coli*-PPase in den Wurzeln überprüft. Die Northern-Blot-Analyse ergab eine starke Expression des gewünschten Genes in den Wurzeln der transgenen Linie UPPa II-2 (Abb. 26B). Auch im Western-Blot konnte das Protein nachgewiesen werden (Abb. 26D). Die Expression des *E. coli*-PPase-Genes resultierte in einer 3.6fach höheren PPase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 26E). Der PPI-Gehalt im Wurzel-Gewebe der transgenen Pflanzen war 40% geringer als im Wildtyp (Tab. 12), wie es schon für die Kartoffel-Knollen gezeigt worden war (Hajirezaei und Sonnewald 1999).

Tab. 12: Gehalte an löslichen Zuckern, Stärke [$\mu\text{mol} \cdot \text{g FW}^{-1}$] und glycolytischen Intermediaten [$\text{nmol} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in Wurzeln von Wildtyp- (Desiree WT) und transgenen Kartoffel-Pflanzen (UPPa II-2) unter aeroben Bedingungen (C) sowie nach 4 Tagen Hypoxie (H). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 bis 12 Proben aus 4 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (*) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (**) für $\alpha < 0.05$.

	Desiree WT		UPPa II-2			
	C	H	C	% des WT	H	% des WT
[$\text{nmol} \cdot \text{g FW}^{-1}$]						
PPI	82.09 \pm 5.65	99.93 \pm 14.41	49.75 \pm 4.63	61 **	50.72 \pm 13.02	51 **
ATP	104.35 \pm 13.60	53.01 \pm 5.78 *	66.65 \pm 8.91	64 **	41.05 \pm 7.10 *	77
[$\mu\text{mol} \cdot \text{g FW}^{-1}$]						
Glucose	1.72 \pm 0.22	11.20 \pm 0.77 *	1.55 \pm 0.18	90	12.13 \pm 1.08 *	108
Fructose	2.50 \pm 0.28	14.55 \pm 0.82 *	2.08 \pm 0.21	83 **	13.63 \pm 0.93 *	94
Saccharose	3.91 \pm 0.31	8.88 \pm 0.48 *	4.28 \pm 0.42	110	13.60 \pm 0.93 *	153 **
Stärke	5.55 \pm 0.51	9.64 \pm 1.02 *	6.25 \pm 0.97	113	10.21 \pm 1.68 *	106
Suc/ Hex	0.93	0.34	1.18		0.53	
[$\text{nmol} \cdot \text{g FW}^{-1}$]						
UDPGlc	48.54 \pm 4.75	67.76 \pm 6.90 *	104.67 \pm 9.37	216 **	97.78 \pm 15.03	144 **
Glc1P	45.69 \pm 10.44	26.51 \pm 4.80 *	63.07 \pm 11.09	138 **	45.61 \pm 11.05	172 **
Glc6P	163.61 \pm 16.40	168.25 \pm 20.63	97.86 \pm 15.25	60 **	78.91 \pm 8.96 *	47 **
Fru6P	33.52 \pm 2.49	34.52 \pm 2.36	16.15 \pm 1.41	48 **	15.70 \pm 1.37	45 **
Fru1,6BP	7.82 \pm 1.06	6.42 \pm 0.74	3.92 \pm 0.86	50 **	2.74 \pm 0.55	43 **
3PGA	47.75 \pm 7.57	40.41 \pm 6.95	10.42 \pm 1.30	22 **	17.02 \pm 2.69 *	42 **
PEP	8.73 \pm 1.94	6.66 \pm 1.47	5.27 \pm 0.72	60	6.02 \pm 0.87	90
Pyruvat	7.70 \pm 1.28	10.63 \pm 0.61 *	11.33 \pm 2.53	147	11.41 \pm 3.30	107
Fru6P/ 3PGA	0.70	0.85	1.55		0.92	
[$\text{pmol} \cdot \text{g FW}^{-1}$]						
Fru2,6BP	210.97 \pm 18.22	157.70 \pm 6.58 *	295.76 \pm 8.43	140 **	155.88 \pm 18.89 *	99



Abb. 27: Transgene Kartoffel-Pflanzen (UPPa II-2, links) sowie Desiree (WT, rechts) im Gewächshaus.

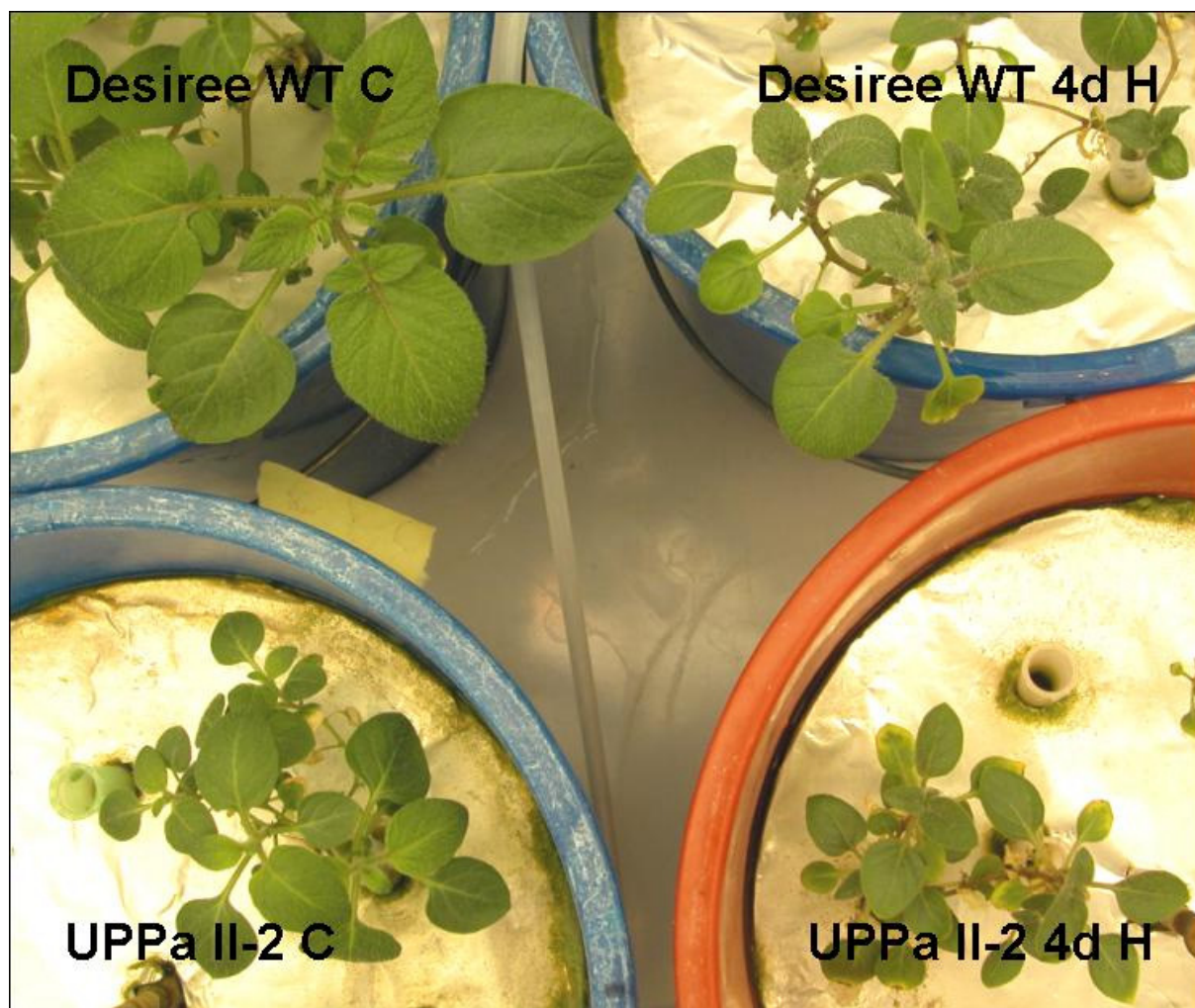


Abb. 28: Transgene Kartoffel-Pflanzen (UPPa II-2) sowie Desiree WT, angezogen in Hydrokultur, nach 4 Tagen Hypoxie (H, rechts) sowie unter belüfteter Kontrolle (C, links).

Sowohl im Gewächshaus (Abb. 27) als auch in Hydrokultur (Abb. 28) zeigten die transgenen Pflanzen ein geringeres Wachstum als der Wildtyp. Dies wurde schon früher beobachtet (Hajirezaei und Sonnewald 1999). Ebenso war die Knollenbildung, wie schon früher beschrieben (Hajirezaei und Sonnewald 1999), verändert. Transgene UPPa II-2-Pflanzen bildeten deutlich mehr, dafür aber kleinere Knollen aus (Tab. 13). Der Gesamtertrag pro Pflanze war dagegen nicht signifikant verändert.

Tab. 13: Knollenerträge von Desiree WT und transgenen Pflanzen, die weniger PPi enthalten (UPPa II-2). Daten sind MW \pm SD von 5 bzw. 10 Pflanzen. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp ($\alpha < 0.05$).

	Anzahl Knollen pro Pflanze	FW Knollen pro Pflanze [g]	FW der größten pro Knolle [g]	FW der größten Knolle [g]
Desiree WT	14 \pm 2	163 \pm 21	12 \pm 2	28 \pm 5
UPPa II-2	27 \pm 8 *	159 \pm 27	6 \pm 2 *	21 \pm 5 *

3.2.1.2 Veränderungen im aeroben Wurzel-Primärstoffwechsel durch verminderten PPi-Gehalt

Für die Analyse der Auswirkungen des verminderten PPi-Gehaltes auf den Stoffwechsel wurden die Gehalte an Zuckern, HexoseP und glycolytischen Intermediaten sowie die Aktivitäten ausgewählter glycolytischer Enzyme gemessen (Tab. 12, Tab. 14). Unter aeroben Bedingungen enthielten die Wurzeln transgener Pflanzen weniger Fructose, aber mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen an Glucose, Saccharose und Stärke (Tab. 12). UDPGlc und Glc1P akkumulierten 2.0 und 1.4-fach in der Linie UPPa II-2, während Glc6P und Fru6P auf 60% bzw. 48% des Wildtyp-Levels reduziert waren. Die Gehalte der glycolytischen Intermediate Fru1,6BP und 3PGA waren in den transgenen Pflanzen deutlich geringer als im Wildtyp, aber PEP und Pyruvat blieben relativ stabil (Tab. 12).

Während in den Knollen transgener Kartoffel-Pflanzen eine 10fache Akkumulation von Fru2,6BP beschrieben worden war (Hajirezaei und Sonnewald 1999), war in den Wurzeln nur 40% mehr Fru2,6BP vorhanden als im Wildtyp. Interessanterweise verringerte sich der ATP-Gehalt in den Pflanzen mit geringerer PPi-Konzentration um 40%. Diese metabolischen Veränderungen könnten ein Hinweis auf eine verringerte Glycolyse-Rate in den transgenen Pflanzen sein, die einen Mangel an Energie verursachen würde. Auch das Wachstum

transgener Pflanzen war unter Kontrollbedingungen deutlich geringer als im Wildtyp, gemessen als Zuwachs während einer 4tägigen Periode (Tab. 15).

Obwohl der Gehalt an UDPGlc in den transgenen Pflanzen höher war als im Wildtyp, veränderten sich die Aktivitäten der Enzyme SuSy und UGPase nicht signifikant (Tab. 14). Auch die gemessenen glycolytischen Enzyme zeigten keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Lediglich die Glucokinase war in der Linie UPPa II-2 um 40% weniger aktiv als im Wildtyp (Tab. 14).

Tab. 14: Aktivitäten sucrolytischer, glycolytischer, und fermentativer Enzyme [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in Wurzeln von Wildtyp- (Desiree WT) und transgenen Kartoffel-Pflanzen (UPPa II-2) unter aeroben Bedingungen (C) sowie nach 4 Tagen Hypoxie (H). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 8 bis 12 Proben aus 4 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (*) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (**) für $\alpha < 0.05$.

	Desiree WT		UPPa II-2			
	C	H	C	% des WT	H	% des WT
	[$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]					
PPase	60 \pm 7	17 \pm 5 *	214 \pm 42	356 **	177 \pm 6	1031 **
SuSy	28 \pm 3	73 \pm 4 *	27 \pm 3	98	57 \pm 5 *	77 **
alk Inv	60 \pm 4	46 \pm 9	56 \pm 4	95	41 \pm 4	88
acid Inv	117 \pm 32	38 \pm 5 *	118 \pm 26	101	45 \pm 8 *	121
UGPase	1964 \pm 285	1514 \pm 103 *	2098 \pm 262	107	1589 \pm 140 *	105
PGM	845 \pm 29	667 \pm 47 *	847 \pm 53	100	699 \pm 60 *	105
Fructokinase	50 \pm 6	18 \pm 6 *	56 \pm 10	111	15 \pm 6 *	84
Glucokinase	53 \pm 11	46 \pm 4	33 \pm 4	63	25 \pm 5	55 **
PFK	153 \pm 19	184 \pm 8	156 \pm 13	102	190 \pm 18	103
PFP	224 \pm 25	185 \pm 10	215 \pm 23	96	186 \pm 15	100
Aldolase	110 \pm 9	97 \pm 9	114 \pm 10	103	83 \pm 9	85 **
Enolase	324 \pm 56	375 \pm 45	311 \pm 48	96	352 \pm 36	94
ADH	121 \pm 16	3770 \pm 491 *	129 \pm 36	106	3378 \pm 303 *	90
PDC	1.7 \pm 1.1	10.8 \pm 1.5 *	0.5 \pm 0.3	31	13.1 \pm 1.6 *	121
LDH	36 \pm 9	80 \pm 14 *	44 \pm 9	120	82 \pm 13 *	103

Tab. 15: Wachstum von Kartoffelpflanzen. Drei Wochen alte Wildtyp- (Desiree WT) und transgene Kartoffelpflanzen (UPPa II-2) wurden für 4 Tage entweder Hypoxie oder normaler Belüftung ausgesetzt. Anschließend wurden die Pflanzen für 4 Tage wiederbelüftet. Das Frischgewicht [g] der Pflanzen, aufgeteilt nach Spross und Wurzeln, wurde zu Beginn des Versuches sowie nach 4 und 8 Tagen ermittelt. Aus drei Experimenten wurde 1 repräsentatives ausgesucht, es werden die Mittelwerte \pm SE von 8 bis 10 Pflanzen gezeigt. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (*) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (**) für $\alpha < 0.05$.

	Desiree WT		UPPa II-2	
	Spross	Wurzel [g]	Spross	Wurzel [g]
0 d	0.97 ± 0.16	0.39 ± 0.08	$0.52 \pm 0.07^{**}$	0.26 ± 0.05
4 d Belüftung	2.43 ± 0.34	1.01 ± 0.16	$1.05 \pm 0.16^{**}$	$0.54 \pm 0.08^{**}$
Wachstum in 4 d	1.46	0.62	0.54	0.28
4 d Hypoxie	$1.51 \pm 0.20^{*}$	$0.42 \pm 0.05^{*}$	$0.82 \pm 0.08^{**}$	$0.29 \pm 0.04^{*}$
Wachstum in 4 d	0.54	0.03	0.30	0.03
8 d Belüftung	4.20 ± 0.26	1.71 ± 0.13	$2.19 \pm 0.24^{**}$	$1.24 \pm 0.16^{**}$
Wachstum in 4 d	1.77	0.70	1.14	0.69
4 d Hypoxie + 4 d				
Wiederbelüftung	$2.81 \pm 0.38^{*}$	1.30 ± 0.20	$1.33 \pm 0.11^{*/**}$	$0.69 \pm 0.06^{*/**}$
Wachstum in 4 d	1.31	0.88	0.51	0.40

3.2.1.3 Primärstoffwechsel transgener UPPa II-2-Pflanzen unter Hypoxie

Neben der Analyse der transgenen Pflanzen unter belüfteten Bedingungen wurden die Kartoffelpflanzen für 4 Tage mit Hypoxie gestresst, indem die Nährlösung mit Stickstoff begast wurde. Diese Behandlung verursachte eine Wachstumshemmung des Wildtyps und der Linie UPPa II-2 (Tab. 15, Abb. 28). Dabei waren die Wurzeln deutlich stärker betroffen als der Spross. Das verringerte Wurzelwachstum wurde begleitet von einer Akkumulation der löslichen Zucker sowohl im Wildtyp als auch in den transgenen Pflanzen (Tab. 12). Dabei erhöhten sich die Mengen an Glucose und Fructose im Wildtyp und in der Linie UPPa II-2 gleichmäßig, jedoch zeigten die transgenen Pflanzen eine stärkere Zunahme des Saccharose-Gehaltes. Dies führte zu einem 30% höheren Saccharose/ Hexose-Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem erhöhte sich durch Hypoxie der Stärke-Gehalt in Wurzeln beider Kartoffel-Linien um 50% (Tab. 12).

Auch die Mengen der glycolytischen Intermediate veränderten sich durch die Hypoxie-Bedingungen. Durch die Stress-Behandlung erhöhte sich der UDPGlc-Gehalt im Wildtyp um 40%, während er in der transgenen Linie unverändert blieb. Dennoch war der absolute Gehalt

an UDPGlc in der transgenen Linie deutlich höher als im Wildtyp (Tab. 12). Die Glc1P-Menge verminderte sich in den Wurzeln beider Linien nach 4 Tagen Hypoxie, blieb aber ebenfalls in der transgenen Linie höher. Die Mengen an Glc6P, Fru6P und Fru1,6BP veränderten sich nach 4 Tagen Hypoxie nicht signifikant, und die absoluten Gehalte waren in den transgenen Pflanzen erneut nur halb so hoch wie im Wildtyp. 3PGA akkumulierte in der Linie UPPa II-2 unter Hypoxie um 60% im Vergleich zur belüfteten Kontrolle, was für den Wildtyp nicht beobachtet worden war, jedoch erreichten die transgenen Pflanzen nicht die höheren Wildtyp-Werte (Tab. 12). Die Mengen an PEP und Pyruvat wurden durch Hypoxie in der Linie UPPa II-2 nicht verändert, während der Wildtyp unter Hypoxie Pyruvat akkumulierte. Der Gehalt an Fru2,6BP verringerte sich nach 4tägiger Hypoxie in beiden Kartoffel-Linien um 40% (Tab. 12).

Obwohl die PPase-Aktivität nach Hypoxie auf 1/3 der belüfteten Werte abfiel (Tab. 14), veränderte sich die Menge von PPi im Wildtyp durch Hypoxie nicht (Tab. 12). Die durch Expression der *E. coli*-PPase verminderte PPi-Konzentration in den transgenen Pflanzen blieb ebenfalls während der Hypoxie-Behandlung stabil. Dagegen veränderte sich der ATP-Gehalt durch den Sauerstoffmangel dramatisch. Als Konsequenz der gehemmten mitochondrialen Atmung fiel der ATP-Gehalt der Wildtyp-Pflanzen während der 4tägigen Hypoxie um 47%, während der Gehalt in den transgenen Pflanzen nur um 23% abfiel. Der absolute ATP-Gehalt war aber immer noch in der Linie UPPa II-2 15% niedriger als im Wildtyp (Tab. 12).

Die beobachteten Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und Wildtypen in den Metabolit-Gehalten weisen darauf hin, dass die Glycolyse in den transgenen Pflanzen gehemmt sein könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurden Enzym-Aktivitäten und *in vivo*-Glycolyseraten gemessen.

Hypoxie verursachte eine starke Induktion der fermentativen Enzyme (ADH, PDC, LDH) in den Wurzeln von Wildtypen und transgenen Pflanzen (Tab. 14), wie auch für andere Arten beschrieben. Während der Aktivitäten der ADH und PDC um das 30- bzw. 10fache anstiegen, wurde die LDH-Aktivität nur verdoppelt. Für die Saccharose-Spaltung war schon bekannt, dass bei Sauerstoffmangel der ATP-sparende Weg über die SuSy und UGPase bevorzugt wird im Vergleich zum Weg über die Invertasen und Hexokinasen (Perata et al. 1996, Perata et al. 1997). Auch in Kartoffeln erhöhte sich nach 4 Tagen Hypoxie die Aktivität der SuSy, während die der Invertasen abfiel (Tab. 14). Dabei stieg die SuSy-Aktivität im Wildtyp auf

das 2.7fache des belüfteten Niveaus, während sie in den transgenen Pflanzen nur um das 2.1fache stieg. Die Aktivitäten der sauren und alkalischen Invertasen verringerten sich um 65% bzw. 25% im Wildtyp und in den UPPa II-2-Pflanzen. Die PGM- und UGPase-Aktivitäten zeigten zwar einen schwachen Abfall unter Hypoxie, aber deren Aktivitäten sind wegen der hohen Grund-Aktivitäten sicher nicht limitierend für den Ablauf der gesamten Reaktion.

Für die gemessenen glycolytischen Enzyme wurden meist keine Veränderung der Aktivität nach 4tägiger Hypoxie festgestellt (Tab. 14). Nur die Fructokinase zeigte eine um 60% geringere Aktivität in beiden Pflanzen-Typen unter Hypoxie, und die Aktivitäten der Glucokinasen waren 10% geringer im Wildtyp und 25% geringer in der Linie UPPa II-2. Hypoxie-Behandlung veränderte weder die Aktivitäten der ATP-abhängigen PFK noch die der PPi-abhängigen PFP in Wildtypen oder transgenen Pflanzen (Tab. 14).

Die Glycolyse-Raten der Kartoffel-Wurzeln wurden mit zwei verschiedenen Systemen gemessen. Die aerobe CO₂-Produktion, die ein Maß für die aerobe Glycolyse und Atmung ist, wurde mit Hilfe des Warburg-Apparates an abgeschnittenen Wurzeln gemessen, die entweder zuvor mit 4 Tagen Hypoxie behandelt worden waren oder nicht. Die aerobe CO₂-Produktion unterschied sich bei vorher belüftet gewachsenen Wurzeln nicht signifikant zwischen Wildtypen und transgenen Pflanzen (Abb. 29A). Vorher mit Hypoxie gestresste Wurzeln vom Wildtyp zeigten die gleiche CO₂-Produktion wie belüftete Wurzeln. Im Gegensatz dazu war die CO₂-Produktion transgener Wurzeln nach Hypoxie-Behandlung 40% geringer als in kontinuierlich belüfteten Wurzeln (Abb. 29A).

Um auch die Glycolyse-Rate unter Anoxie messen zu können, wurde das im Punkt 2.4.2 beschriebene System verwendet. Für die Bestimmung der anaeroben Glycolyse-Raten in den Wurzeln der Kartoffel-Pflanzen wurden diese 2 h in anoxischer Lösung inkubiert. In vorher belüfteten Wurzeln konnte kaum eine Ethanol-Bildung nachgewiesen werden (Abb. 29B). Wurzeln, die vorher 4 Tage in Hypoxie gewachsen waren, zeigten durch die Induktion der Gärungsenzyme ADH und PDC (Tab. 14) sowie durch die Akkumulation von Zuckern (Tab. 12) hohe Gärungsraten (Abb. 29B). Während Hypoxie-behandelte Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen einen 6.8fachen Anstieg der Ethanol-Bildung zeigten, war der Anstieg in Wurzeln transgener Pflanzen nur 3.9fach. Dies geschah, obwohl die transgenen Pflanzen mehr Zucker

akkumuliert hatten (Tab. 12), und keine Unterschiede in der Aktivität der Gärungsenzyme im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Tab. 14).

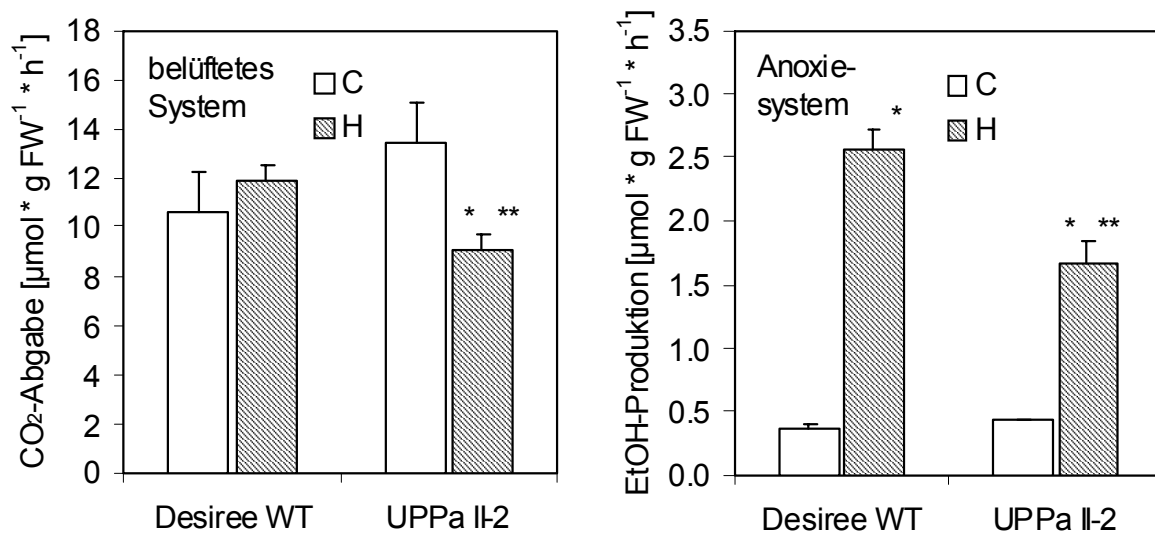


Abb. 29: Glycolyse-Raten in abgeschnittenen Wurzeln von transgenen (UPPa II-2) Kartoffel-Pflanzen sowie vom Wildtyp (Desiree WT) nach 4 Tagen Hypoxie (H) im Vergleich zur belüfteten Kontrolle (C). A: Die CO₂-Produktionsrate [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$] wurde mit Hilfe eines Warburg-Respirometers unter belüfteten Bedingungen bestimmt. B: Die Ethanol-Produktion während einer 2stündigen Anoxie-Phase wurde enzymatisch gemessen. Werte sind Mittelwerte \pm SE von 9 Proben aus 3 unabhängigen Anzuchten. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (*) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (**) bei $\alpha < 0.05$ (T-Test).

3.2.1.4 Wachstum während der Wiederbelüftung

Durch die Einführung einer PPase von *E. coli* in Kartoffel-Pflanzen, die den PPI-Gehalt der Pflanzen verminderte, wurde die glycolytische Aktivität der Wurzeln besonders nach Hypoxie-Behandlung vermindert, wie durch Metabolit-Gehalte, Gaswechsel und Ethanol-Bildung gezeigt wurde (Tab. 12, Abb. 29). Um zu testen, welche Auswirkungen diese Stoffwechselveränderungen auf das Wachstum hatten, wurden die Pflanzen nach 4tägiger Hypoxie für 4 Tage wiederbelüftet, und die Zunahme des Frischgewichtes wurde erneut bestimmt (Tab. 15). Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen wuchsen nach Hypoxie etwa so schnell wie unbehandelte Wurzeln. Das Spross-Wachstum war aber 40% geringer in den gestressten Pflanzen. In transgenen Pflanzen war das Wachstum von Sprossen und Wurzeln nach 4 Tagen Hypoxie signifikant geringer als das von belüfteten Pflanzen, und geringer als im Wildtyp (Tab. 15). Dies zeigt, dass die Fähigkeit zum Wachsen nach einer Hypoxie-Phase durch PPI-Mangel deutlich gehemmt war.

3.2.2 Auswirkung verringerter PFP-Aktivität auf Reaktionen von Kartoffel-Pflanzen unter Hypoxie

Die im letzten Abschnitt gezeigten Experimente an den UPPa II-2-Pflanzen wiesen weder Hypoxie- noch PPI-Mangel-bedingte negative Auswirkungen auf die Aktivität der PFP nach. Im Folgenden sind nun Experimente beschrieben, die an Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität vorgenommen wurden, um diese Ergebnisse ergänzen zu können.

Tab. 16: Aktivitäten von PFK, PFP und ADH [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] sowie Proteingehalte [$\text{mg Protein} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in Wurzeln und Blättern von Wildtyp- (Desiree WT) und transgenen Kartoffel-Pflanzen (PFP-RNAi) unter aeroben Bedingungen (Belüftung) sowie nach 3 Tagen Hypoxie (H). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 5 bis 11 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (**) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (*) für $\alpha < 0.05$.

		PFK	PFP [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	ADH	Protein [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$]
Belüftung					
Blatt	Desiree WT	17.3 \pm 1.4	16.4 \pm 3.5	4.3 \pm 1.6	8.4 \pm 0.5
	PFP #9	16.0 \pm 1.0	0.3 \pm 0.1 *	5.1 \pm 2.3	9.2 \pm 0.6
	PFP #10	16.6 \pm 1.2	2.5 \pm 0.8 *	1.1 \pm 0.5	9.2 \pm 0.3
	PFP #16	16.7 \pm 1.7	0.0 \pm 0.0 *	3.4 \pm 1.6	10.3 \pm 0.4 *
	PFP #19	17.2 \pm 1.3	0.1 \pm 0.0 *	6.1 \pm 3.3	9.2 \pm 0.4
Wurzel	Desiree WT	90.2 \pm 5.1	156.6 \pm 27.2	39.6 \pm 12.0	1.8 \pm 0.2
	PFP #9	96.8 \pm 8.4	27.0 \pm 2.4 *	61.7 \pm 21.3	2.0 \pm 0.3
	PFP #10	89.2 \pm 10.7	78.3 \pm 16.6 *	20.5 \pm 7.5	2.2 \pm 0.2
	PFP #16	88.6 \pm 6.2	7.3 \pm 2.1 *	15.7 \pm 7.3	2.5 \pm 0.2 *
	PFP #19	85.2 \pm 8.5	20.9 \pm 4.0 *	30.7 \pm 13.3	2.0 \pm 0.3
3 d Hypoxie					
Blatt	Desiree WT	13.2 \pm 1.8 **	14.0 \pm 2.9	4.1 \pm 1.5	9.2 \pm 0.7
	PFP #9	16.3 \pm 2.0	0.1 \pm 0.1 *	5.4 \pm 1.4	8.2 \pm 0.6
	PFP #10	22.6 \pm 2.1 */**	5.1 \pm 1.8 *	0.9 \pm 0.8 *	9.2 \pm 0.5
	PFP #16	18.7 \pm 1.3 *	0.0 \pm 0.0 *	8.7 \pm 2.6	7.9 \pm 0.8 **
	PFP #19	16.7 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0 *	5.6 \pm 2.3	8.3 \pm 0.6
Wurzel	Desiree WT	64.3 \pm 6.4 **	125.9 \pm 19.7	2659.5 \pm 288.2 **	2.0 \pm 0.3
	PFP #9	70.6 \pm 8.1 **	23.3 \pm 5.9 *	2279.6 \pm 219.6 **	1.5 \pm 0.3
	PFP #10	70.6 \pm 4.7	47.8 \pm 3.8 *	2029.1 \pm 102.1 */**	2.4 \pm 0.3
	PFP #16	81.4 \pm 6.2 *	1.3 \pm 0.9 */**	2858.2 \pm 282.6 **	2.8 \pm 0.1 *
	PFP #19	63.0 \pm 7.2 **	12.0 \pm 2.2 */**	2827.1 \pm 356.0 **	1.7 \pm 0.4

3.2.2.1 Einfluss verringerter PFP-Aktivität auf Wachstum und Kohlenhydrat-Haushalt unter belüfteten Bedingungen

Von der AG Peter Geigenberger (MPI Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) wurden mir Kartoffel-Pflanzen zur Verfügung gestellt, bei denen die PFP mit Hilfe eines RNAi-Ansatzes gehemmt war. Vier Linien wurden ausgewählt (PFP #9, #10, #16, #19). Zunächst wurde die Aktivität der PFP in den transgenen Linien in Wurzeln und Blättern untersucht. In allen vier Linien war die PFP sowohl in Blättern als auch in Wurzeln deutlich gehemmt (Tab. 16). Die Hemmung betrug bis zu 100% in Blättern sowie bis zu 95% in Wurzeln. Dabei enthielt die Linie PFP#10 noch 15% bzw. 50% Restaktivität in Blättern bzw. Wurzeln, die am stärksten betroffene Linie PFP#16 zeigte keine bzw. 5% Restaktivität (Tab. 16). Die Aktivität der PFK in den PFP-Linien unterschied sich dagegen nicht signifikant vom Wildtyp. Interessanterweise zeigte Linie PFP#16 auch signifikant höhere Gesamt-Proteingehalte, bezogen auf das Frischgewicht, in Wurzeln und Blättern.

Sowohl im Gewächshaus als auch in Gewebekultur wurde bei den transgenen PFP-RNAi-Pflanzen kein deutlicher Phänotyp beobachtet (Abb. 30). Auch in Hydrokultur war das Wachstum vergleichbar mit dem Wachstum des Wildtyps (Abb. 31). Der Knollenertrag unterschied sich ebenfalls nicht signifikant vom Wildtyp (Tab. 17).

Neben den Enzymaktivitäten wurden einige Metabolite des Primärstoffwechsels, die in früher beschriebenen PFP-antisense-Linien verändert waren (Hajirezaei et al. 1994), analysiert. Während sich die Mengen an Glucose und Fructose zwischen Wildtyp und PFP-RNAi-Pflanzen nicht signifikant unterschieden, akkumulierten einige Linien mehr Saccharose (PFP#10, 16 und 19), und eine Linie (PFP#19) enthielt signifikant mehr Stärke (Tab. 18). Diese Veränderungen traten zumeist in Blättern und Wurzeln auf. Der ATP-Gehalt unterschied sich nicht signifikant im Vergleich zum Wildtyp. Dagegen zeigten alle transgenen Linien tendenziell mehr Glc6P (Tab. 19). Dabei war der Glc6P-Gehalt in den Linien PFP#9 und PFP#10 in den Blättern sowie in der Linie PFP#16 in den Wurzeln signifikant erhöht.

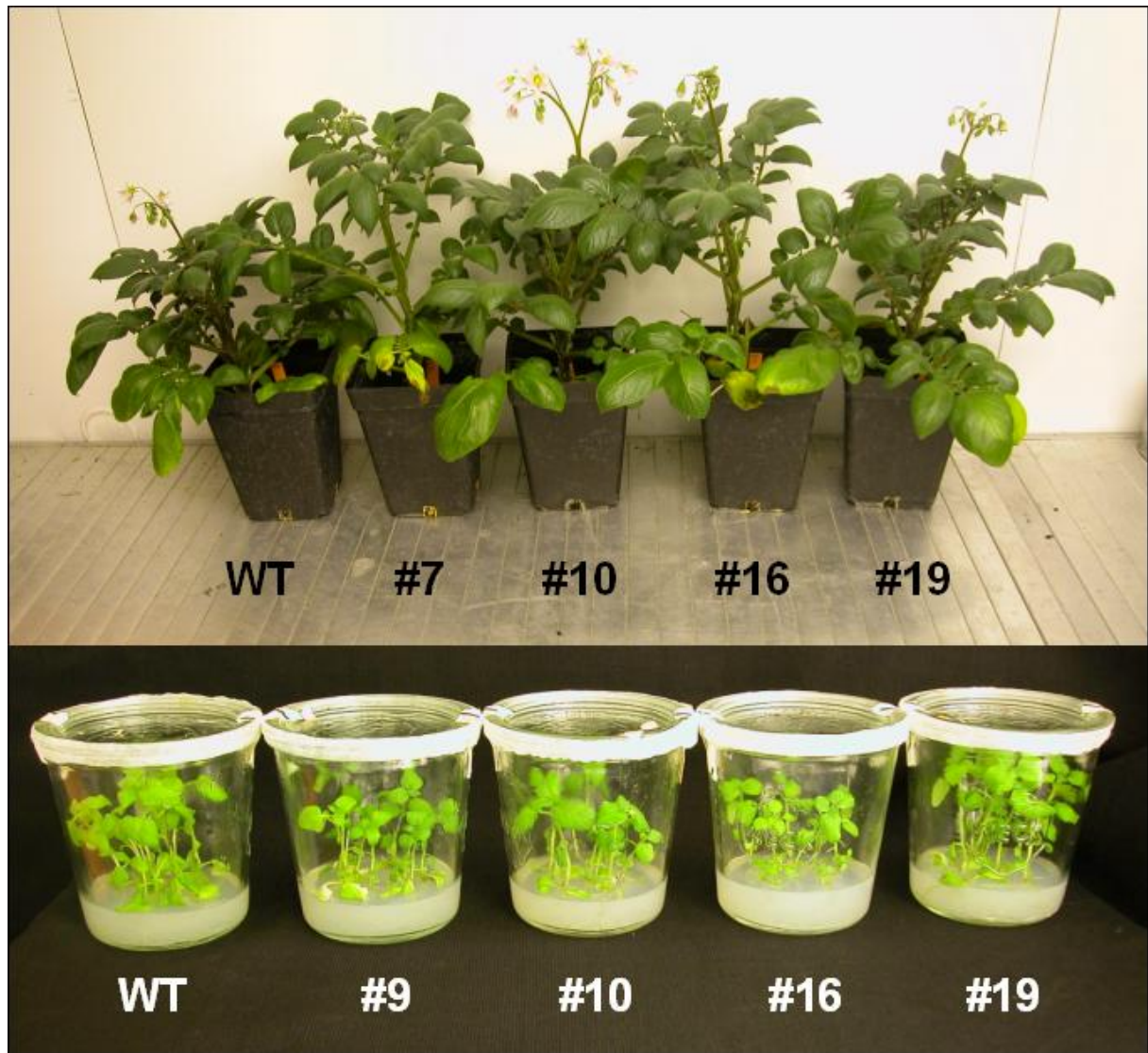


Abb. 30: Transgene Kartoffel-Pflanzen (PFP-RNAi, Nummern 7 bis 19) sowie Desiree Wildtyp (WT), angezogen aus Knollen in der Phytokammer, 5 Wochen nach dem Auslegen (oben), sowie in Gewebekultur (unten).

Tab. 17: Knollenerträge von Desiree WT und transgenen PFP-RNAi-Pflanzen. Daten sind MW \pm SD von 3 Pflanzen.

Linie	FW der Knollen in g
WT	122 \pm 30
#5	104 \pm 2
#7	116 \pm 1
#9	127 \pm 1
#10	112 \pm 9
#16	110 \pm 22
#19	114 \pm 13

Tab. 18: Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in Wurzeln und Blättern von Wildtyp- (Desiree WT) und transgenen Kartoffel-Pflanzen (PFP-RNAi) unter aeroben Bedingungen (Belüftung) sowie nach 3 Tagen Hypoxie (H). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 bis 12 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (**) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (*) für $\alpha < 0.05$.

		Glucose	Fructose	Saccharose	Stärke
		[mg * g FW ⁻¹]			
Belüftung					
Blatt	Desiree WT	0.33 ± 0.09	0.29 ± 0.07	1.07 ± 0.10	3.24 ± 0.68
	PFP #9	0.20 ± 0.06	0.31 ± 0.07	1.19 ± 0.12	3.37 ± 0.74
	PFP #10	0.31 ± 0.06	0.40 ± 0.04	1.50 ± 0.13 *	4.46 ± 1.08
	PFP #16	0.20 ± 0.03	0.27 ± 0.06	1.52 ± 0.12 *	4.32 ± 0.88
	PFP #19	0.21 ± 0.04	0.39 ± 0.08	1.60 ± 0.13 *	5.37 ± 0.79 *
Wurzel	Desiree WT	0.09 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.06 ± 0.01
	PFP #9	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.44 ± 0.06	0.07 ± 0.02
	PFP #10	0.11 ± 0.03	0.27 ± 0.06	0.46 ± 0.05 *	0.06 ± 0.01
	PFP #16	0.10 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.47 ± 0.04 *	0.07 ± 0.02
	PFP #19	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.03 ± 0.01 *
3 d Hypoxie					
Blatt	Desiree WT	2.96 ± 0.25 **	4.23 ± 0.38 **	1.81 ± 0.13 **	3.60 ± 1.19
	PFP #9	2.09 ± 0.30 */**	2.92 ± 0.39 */**	1.39 ± 0.12 *	5.05 ± 2.13
	PFP #10	3.06 ± 0.22 **	4.59 ± 0.25 **	1.89 ± 0.13 **	5.68 ± 1.22
	PFP #16	2.69 ± 0.28 **	3.93 ± 0.35 **	1.67 ± 0.18	6.93 ± 1.99
	PFP #19	1.54 ± 0.27 */**	2.78 ± 0.38 */**	1.61 ± 0.14	6.06 ± 1.23
Wurzel	Desiree WT	1.35 ± 0.14 **	1.84 ± 0.13 **	0.55 ± 0.05 **	0.03 ± 0.01
	PFP #9	0.93 ± 0.14 */**	1.58 ± 0.23 **	0.50 ± 0.12	0.03 ± 0.01
	PFP #10	1.32 ± 0.25 **	1.78 ± 0.32 **	0.54 ± 0.11	0.03 ± 0.01
	PFP #16	1.77 ± 0.14 */**	2.22 ± 0.16 */**	0.73 ± 0.06 */**	0.04 ± 0.01
	PFP #19	1.25 ± 0.24 **	1.64 ± 0.27 **	0.61 ± 0.11	0.03 ± 0.01

3.2.2.2 Gärungsstoffwechsel von Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität

Um eine eventuelle Auswirkung der verminderten PFP-Aktivität auf die Reaktionen von Kartoffelpflanzen unter Sauerstoffmangel herauszufinden, wurden diese für 3 Tage im Wurzelraum mit Stickstoff begast (= Hypoxie). Anschließend wurden neben dem Wachstum auch einige Enzymaktivitäten und Metabolite sowie die Gärungsraten bestimmt. Letzterer Wert war ein sich deutlich unterscheidendes Merkmal zwischen den UPPa-II-2-Pflanzen und dem Desiree-Wildtyp gewesen (siehe Punkt 3.2.1.3).

Tab. 19: Gehalte an Glc6P und ATP [nmol * g FW⁻¹] in Wurzeln und Blättern von Wildtyp- (Desiree WT) und transgenen Kartoffel-Pflanzen (PFP-RNAi) unter aeroben Bedingungen (Belüftung) sowie nach 3 Tagen Hypoxie (H). Alle Werte sind Mittelwerte ± SE von 6 bis 12 Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Belüftung und Hypoxie (**) sowie zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen (*) für $\alpha < 0.05$.

		Glc6P	ATP
		[nmol * g FW ⁻¹]	
Belüftung			
Blatt	Desiree WT	196 ± 17	51 ± 3
	PFP #9	258 ± 25 *	52 ± 6
	PFP #10	251 ± 21 *	58 ± 3
	PFP #16	228 ± 14	59 ± 5
	PFP #19	205 ± 10	49 ± 3
Wurzel	Desiree WT	126 ± 21	53 ± 7
	PFP #9	163 ± 29	49 ± 7
	PFP #10	153 ± 23	51 ± 5
	PFP #16	213 ± 23 *	58 ± 4
	PFP #19	154 ± 17	43 ± 5
3 d Hypoxie			
Blatt	Desiree WT	112 ± 20 **	57 ± 2
	PFP #9	173 ± 53	60 ± 2
	PFP #10	107 ± 7 **	64 ± 5
	PFP #16	127 ± 16 **	72 ± 5 */ **
	PFP #19	122 ± 17 **	71 ± 6 */ **
Wurzel	Desiree WT	129 ± 25	58 ± 7
	PFP #9	89 ± 18 **	35 ± 5 *
	PFP #10	103 ± 28	46 ± 6
	PFP #16	113 ± 16 **	55 ± 7
	PFP #19	100 ± 19 **	46 ± 4

Hypoxie-Behandlung verursachte die bereits beschriebene Akkumulation von Kohlenhydraten in Wurzeln, aber auch in den Blättern der Pflanzen (Tab. 18). Dabei erhöhte sich vor allem der Glucose- und Fructose-Gehalt sowohl in Blättern als auch in Wurzeln auf das 7- bis 15fache der belüfteten Kontrolle. Der Saccharose-Gehalt stieg um maximal 70%, und Stärke akkumulierte nur in Blättern nach 3tägiger Hypoxie leicht. Im Vergleich zwischen transgenen Pflanzen und dem Wildtyp zeigte sich bei einigen Linien ein signifikant verminderter Anstieg der löslichen Kohlenhydrate in den Blättern (PFP#9, PFP#19) bzw. in den Wurzeln (PFP#9,

Tab. 18). Linie PFP#16, bei der die PFP-Aktivität am stärksten gehemmt war, akkumulierte dagegen signifikant mehr Kohlenhydrate als der Wildtyp.

Die Pflanze reagierte außerdem mit modifizierten Glc6P-Gehalten auf Hypoxie. Während der Glc6P-Gehalt in den Blättern aller Linien nach 3 Tagen Hypoxie um 45 bis 55 % abnahm, sank er in den Wurzeln zwar in den transgenen Linien, nicht aber im Wildtyp, um 35 bis 45 % ab (Tab. 19). Bei belüfteten Bedingungen enthielten die transgenen Linien zumeist mehr Glc6P als der Wildtyp, jedoch wurde dies nach Hypoxie nicht beobachtet. Der ATP-Gehalt war erstaunlicherweise in den Wurzeln der Kartoffelpflanzen durch Behandlung mit 3 Tagen Hypoxie noch nicht deutlich vermindert (Tab. 19), wie es nach 4 Tagen Hypoxie gemessen worden war (Tab. 12). In den Blättern zweier transgener Linien (PFP#16, PFP#19) wurde dagegen sogar einen Anstieg von ATP um 20 bzw. 40% bei Hypoxie nachgewiesen.

Die Aktivität der PFP war auch nach 3 Tagen Hypoxie in den transgenen Linien deutlich vermindert. In den Wurzeln war die Hemmung der PFP-Aktivität sogar noch stärker ausgeprägt als unter belüfteten Bedingungen (Tab. 16). Dies hängt wahrscheinlich mit der allgemeinen Tendenz der Kartoffel-Pflanzen zusammen, die PFP-Aktivität bei Hypoxie zu vermindern, da auch der Wildtyp leicht verringerte PFP-Aktivitäten zeigt. Die PFK-Aktivität ging in einigen der beobachteten Linien sowie im Wildtyp ebenfalls zurück. Dabei war auffällig, dass die Linie PFP#16 nach Hypoxie etwa 30% höhere PFK-Aktivitäten in Wurzeln und Blättern aufwies als der Wildtyp. Die Aktivität der ADH stieg nach Hypoxie auf bis zu 100fach höhere Werte im Vergleich zur belüfteten Kontrolle, jedoch nur in den Wurzeln der Pflanzen. Die Sprosse induzierten unter diesen Bedingungen keine ADH (Tab. 16). Erstaunlicherweise zeigte eine transgene Linie in jedem der untersuchten Gewebe eine geringere ADH-Aktivität als alle anderen Linien und als der Wildtyp (PFP#10).

Hypoxie verringerte auch in diesem Versuch das Wachstum der Kartoffel-Pflanzen. Sowohl Sprosse als auch Wurzeln zeigten nach 3 Tagen Hypoxie ein um 30 bis 50% geringeres Frischgewicht als unter Kontrollbedingungen (Abb. 31). Dabei traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und transgenen Pflanzen auf.

An abgeschnittenen Wurzeln von mit 3 Tagen Hypoxie vorbehandelten Pflanzen sowie von belüfteten Kontrollpflanzen wurde außerdem die Ethanol-Produktion innerhalb von 4 h in dem bereits beschriebenen abgeschlossenen System bestimmt. Während nicht hypoxisch

vorbehandelte Pflanzen nur eine sehr geringe Menge an Ethanol produzieren konnten, zeigten Wurzeln nach 3 Tagen Hypoxie 10mal höhere Gärungsraten (Abb. 32). Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und Pflanzen mit verminderter PFP-Aktivität zu beobachten.

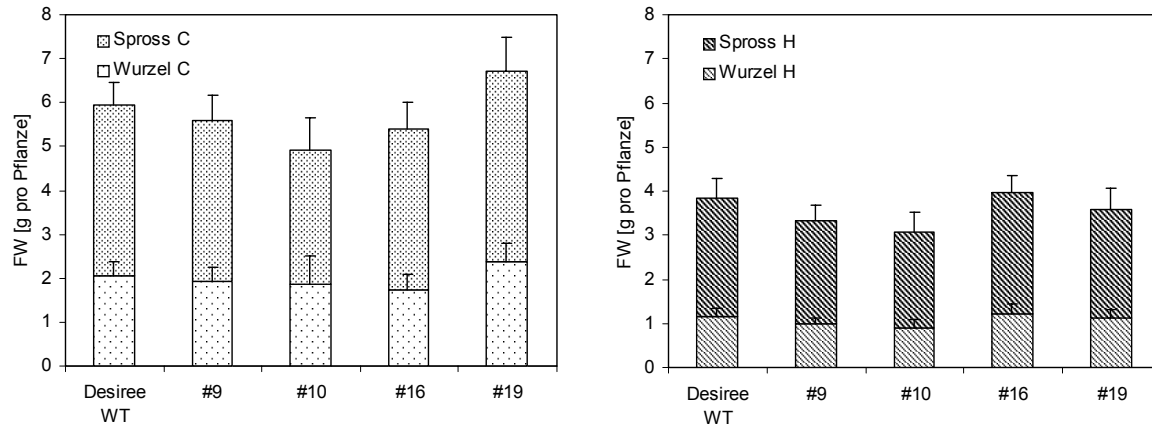


Abb. 31: Frischgewicht [g] transgener Kartoffel-Pflanzen mit einer verminderten PFP-Aktivität (PFP-RNAi) sowie vom Wildtyp (Desiree WT), bei Belüftung (C, links) oder nach einer 3tägigen Hypoxie-Phase (H, rechts), aufgeteilt in Wurzeln und Sprosse. Werte sind Mittelwerte \pm SE von insgesamt 10 bis 20 Pflanzen aus 8 unabhängigen Anzuchten. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

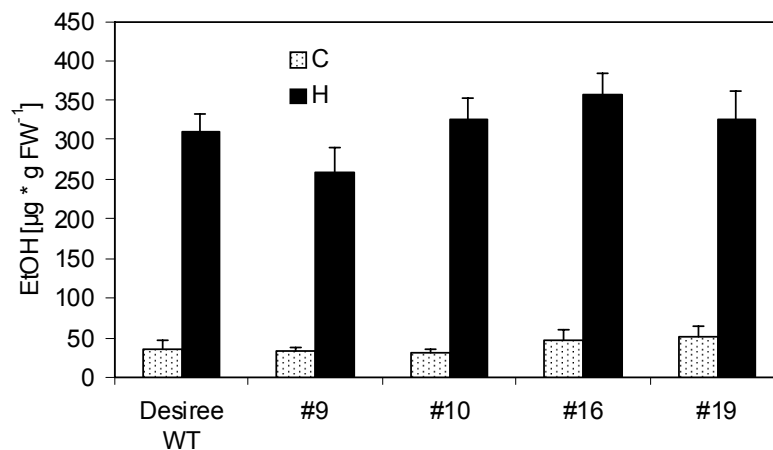


Abb. 32: Ethanol-Produktion [$\mu\text{g} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in abgeschnittenen Wurzeln transgener Kartoffel-Pflanzen mit einer verminderten PFP-Aktivität (PFP-RNAi) sowie vom Wildtyp (Desiree WT), die vorher entweder mit 3 Tagen Hypoxie (H) behandelt wurden oder normal belüftet waren (C), innerhalb von 4 h Anoxie. Werte sind Mittelwerte \pm SE von insgesamt 9 bis 17 Proben aus 5 unabhängigen Anzuchten. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant bei $\alpha < 0.05$.

3.2.3 Auswirkungen einer Hemmung der PF2K auf die Gärung in Kartoffel-Wurzeln

Frühere Experimente an Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität zeigten eine Akkumulation von Fru2,6BP, die die verminderte PFP-Aktivität zumindest teilweise kompensierte (Hajirezaei et al. 1994, Paul et al. 1995, Nielsen und Stitt 2001). Außerdem war gezeigt worden, dass zumindest Reis-Pflanzen unter Sauerstoffmangel Fru2,6BP akkumulierten (Kato-Noguchi und Watada 1996, Kato-Noguchi 2002). Daher sollten Pflanzen mit geringerer PF2K-Aktivität und damit verminderten Fru2,6BP-Gehalt hergestellt und unter Hypoxie untersucht werden, um die Funktion von Fru2,6BP im Gärungsstoffwechsel herauszufinden.

3.2.3.1 Herstellung und Selektion der F2,6BP-RNAi-Pflanzen

Nach Amplifikation des PF2K-Genes mittels PCR und Herstellung des Fru2,6BP-RNAi-Konstruktes (Abb. 33) wurden Kartoffeln durch A. Knospe stabil transformiert. Es konnten 32 Pflanzen regeneriert werden. Diese wurden für eine Primäranalyse ins Gewächshaus gebracht. Aus Blättern wurde RNA isoliert, und mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse sollten positive Linien ermittelt werden. Etwa 19 Pflanzen zeigten dabei RNAi-Fragmente. Es wurden anschließend 5 Linien mit nachgewiesener RNAi-vermittelter Degradierung der PF2K-mRNA ausgewählt (F2,6BP#16, 26, 28, 29, 30). Außerdem wurde eine Linie mit stark vermindertem Wachstum untersucht, die allerdings bei der ersten Analyse keine RNAi-Banden gezeigt hatte (F2,6BP#12). Diese wurden erneut auf Expression des PF2K-Genes hin untersucht (Abb. 34).

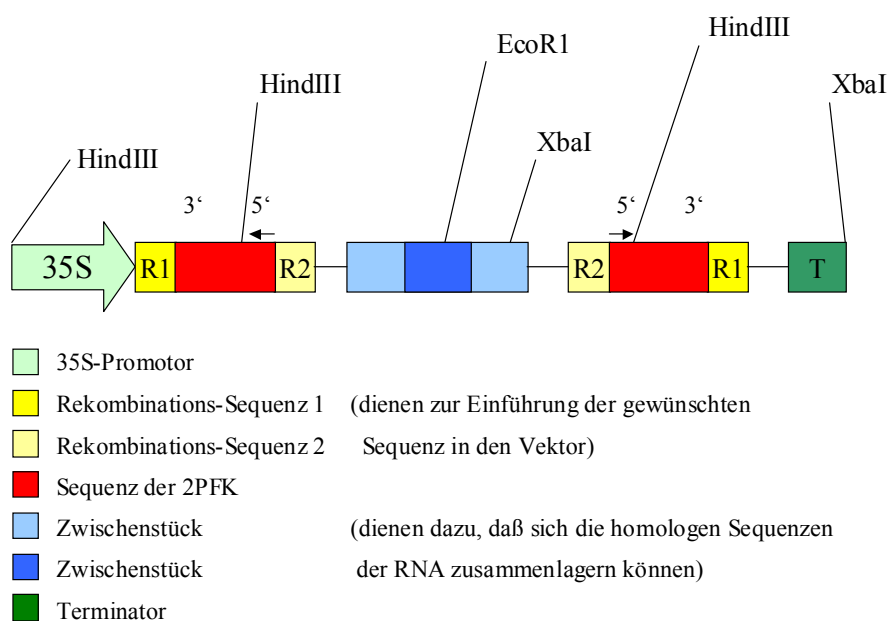


Abb. 33: Schematische Struktur des F2,6BP-RNAi-Konstruktes

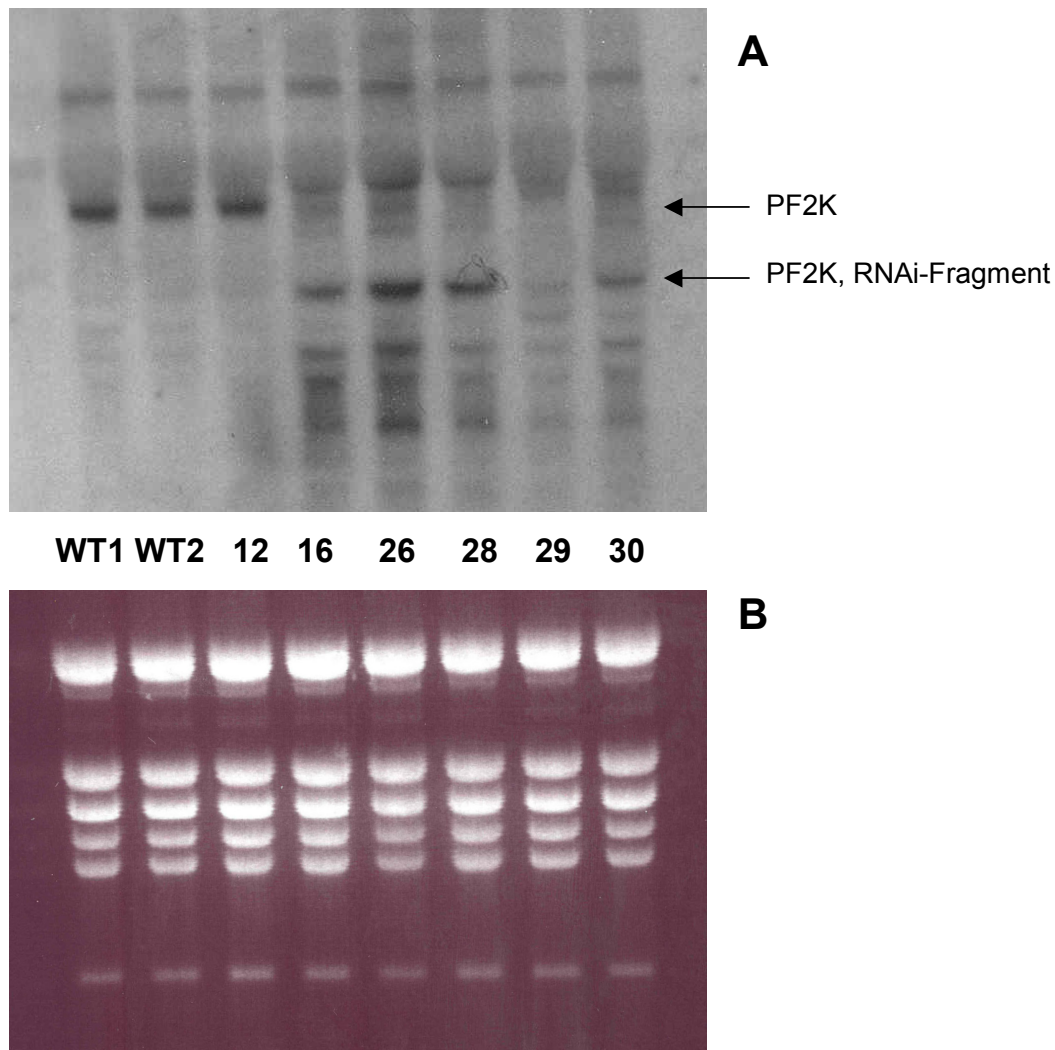


Abb. 34: Northern-Blot-Analyse der F2,6BP-Linien. Aus Blättern von Kartoffeln (cv. Solara), die mit einem F2,6BP-RNAi-Konstrukt transformiert worden waren, wurde RNA extrahiert und ein Northern-Blot angefertigt. **A:** Hybridisierung mit dem PF2K-Fragment; **B:** Beladung des Gels mit mRNA. WT, Wildtyp; 12 - 30, Nummern der transgenen Linien.

Es bestätigte sich, dass in den 5 Linien die intakte RNA des PF2K-Genes kaum noch sichtbar war, dabei aber zahlreiche kleinere Fragmente der RNA auftauchten. Die Linie F2,6BP#12 dagegen zeigte keine Verringerung des PF2K-Transkripts. Die hier ausgewählten Linien wurden in Gewebekultur vermehrt und für weitere Versuche verwendet.

3.2.3.2 Effekte eines veränderten Fru2,6BP-Gehaltes auf Wachstum und Primärstoffwechsel unter belüfteten Bedingungen

Bei zwei Anzuchten der transgenen Pflanzen im Gewächshaus bzw. einer Anzucht in der Phytokammer in Erdkultur zeigte sich kein deutlicher Phänotyp. Das Wachstum war bei allen Linien ähnlich. Allerdings wiesen einige Exemplare der Linien F2,6BP#26, #28, #29 und #30 ein etwas verringertes Längenwachstum auf, und die Blattmorphologie war leicht verändert

(Abb. 35). Jedoch müssen, um genauere Aussagen darüber treffen zu können, mehr Pflanzen analysiert werden. Auch in Gewebekultur sowie in Hydrokultur verhielten sich die meisten F2,6BP-Pflanzen wie der Wildtyp. Lediglich die Linie F2,6BP#30 war in Gewebekultur häufig kürzer als die anderen Linien.

Auffällig war, dass sich generell die Varietät Solara anders verhielt als Desiree. So zeigte Solara in Gewebekultur ein doppelt so schnelles Spross-Wachstum wie Desiree. Die Wurzel-Bildung war dagegen vergleichbar schnell oder langsamer. Auch war zu beobachten, dass nach längerer Verweildauer in Gewebekultur (mehr als 4 Wochen) die Wurzeln begannen abzusterben. Es zeigte sich außerdem, dass die Überführung der Solara-Pflanzen aus der Gewebekultur in Hydrokultur schwieriger war als bei Desiree. Es kam häufiger zum Absterben der Pflanzen, was hauptsächlich auf Probleme beim Wurzel-Wachstum zurückzuführen war. Auch nach Ausbildung der Wurzeln waren diese meist deutlich kürzer als bei Pflanzen der Varietät Desiree.

Die Hemmung der Expression der PF2K sollte in einer Verminderung des Fru2,6BP-Gehaltes resultieren. Bei der Messung der Fru2,6BP-Gehalte traten aber in mehreren Versuchen erhebliche technische Probleme auf, so dass bis jetzt diese Werte nicht reproduzierbar erhoben werden konnten. In Zukunft sollen diese Ergebnisse ergänzt werden.



Abb. 35: Transgene Kartoffel-Pflanzen (F2,6BP-RNAi, Nummern 12 bis 30) sowie Solara Wildtyp (WT), angezogen aus Knollen in der Phytokammer, 6 Wochen nach dem Auslegen.

Da für von anderen Arbeitsgruppen hergestellte Pflanzen mit geringeren Fru2,6BP-Gehalten (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001, Rung et al. 2004) bereits festgestellt wurde, dass sich in ihnen der Kohlenhydrat-Haushalt veränderte, wurden in den hier gezeigten transgenen Pflanzen die löslichen Kohlenhydrate sowie Stärkegehalte bestimmt. In den Blättern unterschieden sich nur die Mengen an Stärke signifikant vom Wildtyp (Tab. 20). Die Blätter der Linien F2,6BP#16, #28 und #30 enthielten, wie bereits für andere Pflanzen beschrieben (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001), weniger Stärke. In Wurzeln fand sich in einer Linie mehr Glucose (F2,6BP#26), in einigen mehr Fructose (F2,6BP#26, #29, #30), und in einigen Linien signifikant mehr Saccharose als im Wildtyp (F2,6BP#16, #29).

Tab. 20: Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke [$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$] in Wurzeln und Blättern von Wildtyp (Solara WT) und F2,6BP-RNAi Kartoffel-Pflanzen (F2,6BP) unter aeroben Bedingungen. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SE von 6 (Wurzeln) bzw. 15 (Blätter) Proben aus 3 unabhängigen Experimenten. Der T-Test wurde angewendet, um signifikante Änderungen aufzuzeigen. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen für $\alpha < 0.05$.

		Glucose	Fructose	Saccharose	Stärke
		[$\text{mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$]			
Blatt	Solara WT	0.13 ± 0.06	0.17 ± 0.05	1.02 ± 0.06	4.57 ± 0.55
	F2,6BP #12	0.16 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.88 ± 0.08	3.24 ± 0.52
	F2,6BP #16	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.87 ± 0.10	$1.97 \pm 0.30^*$
	F2,6BP #26	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.95 ± 0.04	4.00 ± 0.53
	F2,6BP #28	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.04	1.00 ± 0.06	$2.55 \pm 0.24^*$
	F2,6BP #29	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	1.11 ± 0.10	3.36 ± 0.55
	F2,6BP #30	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.03	1.14 ± 0.09	$2.93 \pm 0.43^*$
Wurzel	Solara WT	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.06 ± 0.02
	F2,6BP #12	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.43 ± 0.03	0.07 ± 0.01
	F2,6BP #16	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.05	$0.42 \pm 0.02^*$	0.08 ± 0.02
	F2,6BP #26	$0.19 \pm 0.05^*$	$0.28 \pm 0.08^*$	0.39 ± 0.04	0.06 ± 0.01
	F2,6BP #28	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.34 ± 0.04	0.04 ± 0.02
	F2,6BP #29	0.09 ± 0.02	$0.20 \pm 0.03^*$	$0.48 \pm 0.04^*$	0.10 ± 0.02
	F2,6BP #30	0.07 ± 0.01	$0.15 \pm 0.02^*$	0.37 ± 0.04	0.06 ± 0.02

3.2.3.3 Gärungsstoffwechsel von Kartoffel-Pflanzen mit verringertem Fru2,6BP-Gehalt unter Hypoxie

Während Kartoffel-Pflanzen der Varietät Desiree 3 bis 4 Tage Hypoxie überleben konnten, wenn auch das Wachstum eingeschränkt war (Tab. 15, Abb. 28), so starben in mehreren Versuchen die Wurzeln der Solara-Pflanzen sowie der F2,6BP-Linien während dieser Zeit

komplett ab, so dass weitere Experimente dieser Dauer nicht ratsam waren. Aus diesem Grund wurde der im Folgenden beschriebene Versuch nur mit 2 Tagen Hypoxie-Behandlung durchgeführt.

Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, ob Fru2,6BP als Aktivator der glycolytischen Richtung der PFP auch unter Sauerstoffmangel wichtig sein könnte. Dazu wurde ein Gärungsversuch, wie für die UPPa II-2-Pflanzen und die PFP-RNAi-Pflanzen beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich in zwei Linien (F2,6BP#16, F2,6BP#26) eine erhöhte Gärungsrate im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 36). In den Linien F2,6BP#28, #29 und #30 war sie dagegen unverändert.

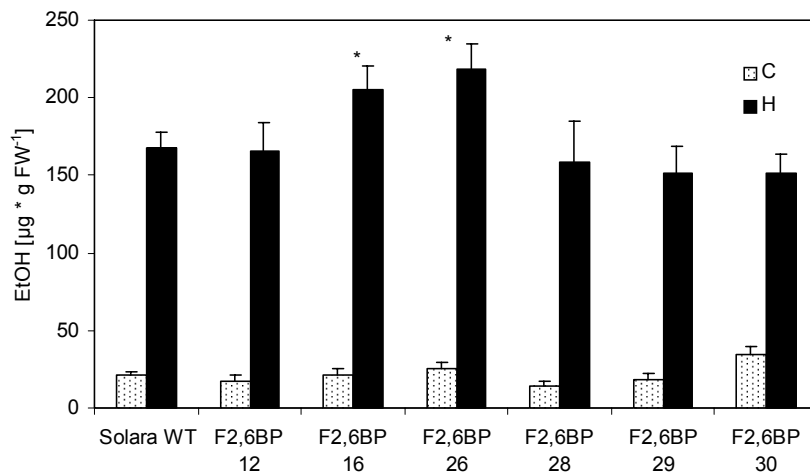


Abb. 36: Ethanol-Produktion [$\mu\text{g} * \text{g FW}^{-1}$] in abgeschnittenen Wurzeln transgener Kartoffel-Pflanzen mit einer verminderten PF2K/Fru2,6BPase-Aktivität (F2,6BP) sowie vom Wildtyp (Solara WT), die vorher entweder mit 2 Tagen Hypoxie (H) behandelt wurden oder normal belüftet waren (C), innerhalb von 4 h Anoxie. Werte sind Mittelwerte \pm SE von insgesamt 12 bis 16 Proben aus 5 unabhängigen Anzuchten. Sternchen zeigen signifikante Änderungen zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen bei $\alpha < 0.05$ (T-Test).

3.3 Charakterisierung der PFK-Familie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Sequenz der pflanzlichen PFK zu finden, da diese ein wichtiges Enzym in der pflanzlichen Glycolyse ist. Es wurde für diese Experimente *Arabidopsis thaliana* ausgewählt, da das Genom dieser Pflanze bereits vollständig sequenziert ist, und so für eine Suche nach unbekannten Sequenzen geeignet erschien.

3.3.1 Suche nach PFK-kodierenden Genen mittels bioinformatischer Ansätze

Zu Beginn dieser Arbeiten Ende 2003 waren in der „GenBank“-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) noch keine pflanzlichen PFK-Sequenzen verfügbar. Einige Sequenzen waren als „putative PFP“ annotiert. Um alle zu einer PFK aus *Anabaena* (Stamm PCC7120, Gene Entry: all7335) homologen Sequenzen im *Arabidopsis*-Genom zu finden, habe ich die Internet-Seite der „Cyanobacteria Gene Annotation Database“ genutzt (<http://cyano.genome.ad.jp/>). Dabei wurden 11 PFK-ähnliche Gene gefunden (At1g12000, At1g20950, At1g76550, At2g22480, At4g04040, At4g26270, At4g29220, At4g32840, At5g47810, At5g56630, At5g61580).

Ein Sequenzvergleich dieser 11 Gene mit bereits bekannten PFP-Sequenzen aus verschiedenen Pflanzen und PFK-Genen aus Tieren und Einzellern wurde anschließend durchgeführt. Als Außengruppe diente die PF2K. Es ergaben sich 4 verschiedene Gruppen von PFKs (Abb. 37). Die erste, als „Außengruppe“ fungierende PF2K enthielt das *Arabidopsis*-Gen At1g07110 (Villadsen et al. 2000), welches homolog ist zu bereits bekannten PF2Ks von Kartoffeln und Spinat (Larondelle et al. 1986, Draborg et al. 1999). Zwei weitere Gruppen enthielten die bereits bekannten α - und β -Untereinheiten der PFPs aus Kartoffel, *Ricinus communis* und *Citrus x paradisi* (Carlisle et al. 1990, Todd et al. 1995, Kapri und Sadka 1998). Zu jeder dieser beiden Gruppen gehörten zwei *Arabidopsis*-Gene (PFP- α , At1g20950, At1g76550; PFP- β , At1g12000, At4g04040). Die letzte Gruppe der *Arabidopsis*-Phosphofructokinase-Gene war am ehesten verwandt mit verschiedenen PFKs aus Einzellern, und enthielt die übrigen 7 Sequenzen. Diese 7 Gene wurden als putative PFKs ausgewählt. Die putativen PFK-Gene wurden nummeriert und einer ersten Analyse über Größen und intracellulärer Lokalisation unterzogen (Tab. 21). Außerdem wurde von Dr. Sophia Biemelt eine Klonierungsstrategie entworfen.

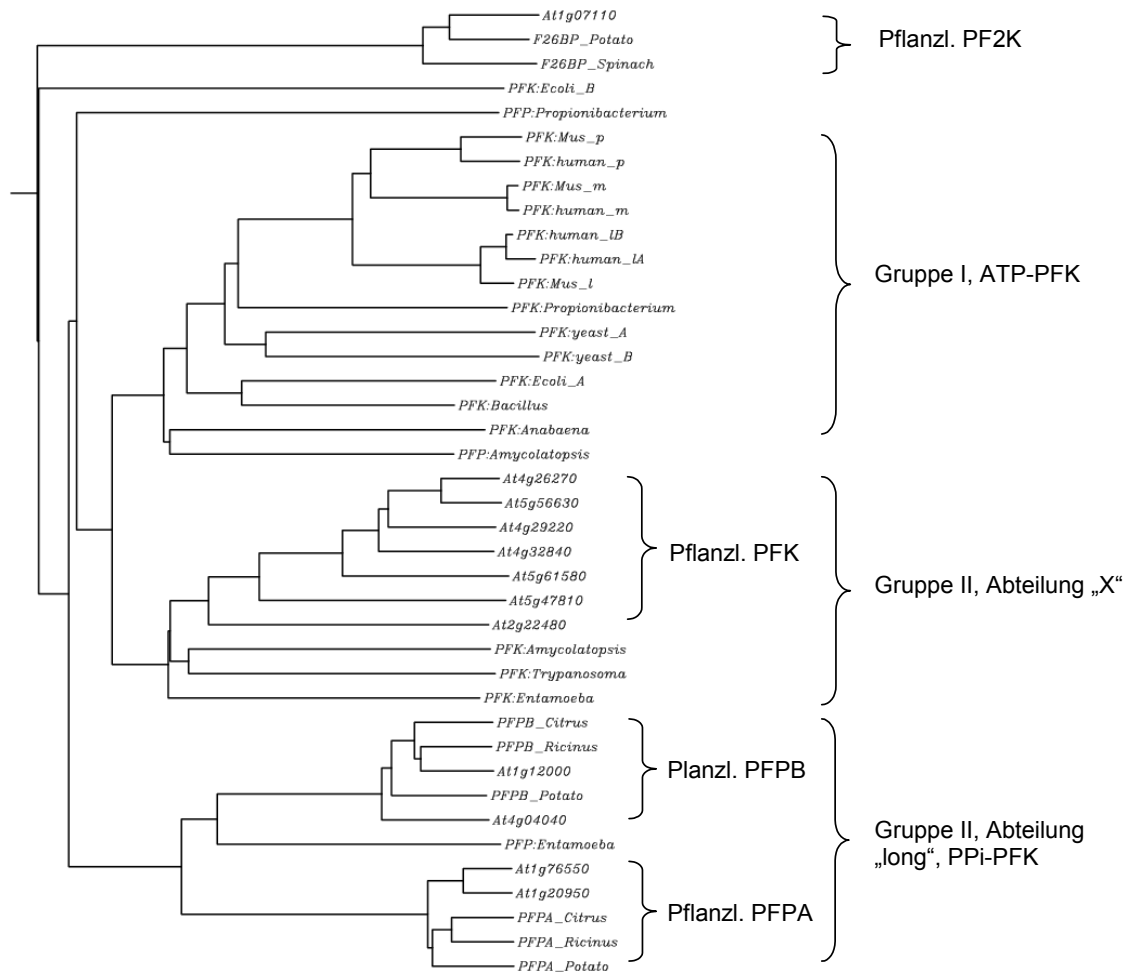


Abb. 37: Sequenzvergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener Phosphofructokinasen. „Unrooted NJ tree“ für 40 ausgewählte Phosphofructokinase-Sequenzen. Die monophyletischen Gruppen wurden benannt nach Müller et al. (2001). Die Zugangs-Nummern für die Protein-Sequenzen sind die folgenden: F26BP_Potato, AAC26113; F26BP_Spinach, AAC18055; PFK_Ameycolatopsis, AAL39011; PFK_Anabaena, BAB77093; PFK_Bacillus, NP_390797; PFK_Ecoli_A, NP_756721; PFK_Ecoli_B, NP_754015; PFK_Entamoeba, S49458; PFK_human_IA, NP_001002021; PFK_human_IB, NP_002617; PFK_human_m, NP_000280; PFK_human_p, NP_002618; PFK_Mus_I, NP_032852; PFK_Mus_m, NP_067489; PFK_Mus_p, NP_062677; PFK_Propionibacterium, YP_056927; PFK_Trypanosoma, AAC47836; PFK_Yeast_A, NP_011756; PFK_Yeast_B, NP_013932; PFP_Ameycolatopsis, AAL39011; PFP_Entamoeba, AAC04465; PFP_Propionibacterium, YP_055795; PFPA_Citrus, AAC67587; PFPA_Potato, P21342; PFPA_Ricinus, Q41140; PFPB_Citrus, AAC67586; PFPB_Potato, P21343; PFPB_Ricinus, Q41141.

Auch in der Exon-Intron-Struktur unterschieden sich die 7 PFK-Gene von den Genen der PFP (Abb. 38). In der Gruppe der putativen PFKs gab es allerdings unterschiedliche Exon-Strukturen. Während sich die PFKs 1, 3, 4, 6 und 7 ziemlich ähnlich sahen, war die Verteilung der Introns bei PFK5 deutlich verändert im Vergleich zu den anderen Isoformen, und PFK2 besaß nur 1 Intron (Abb. 38).

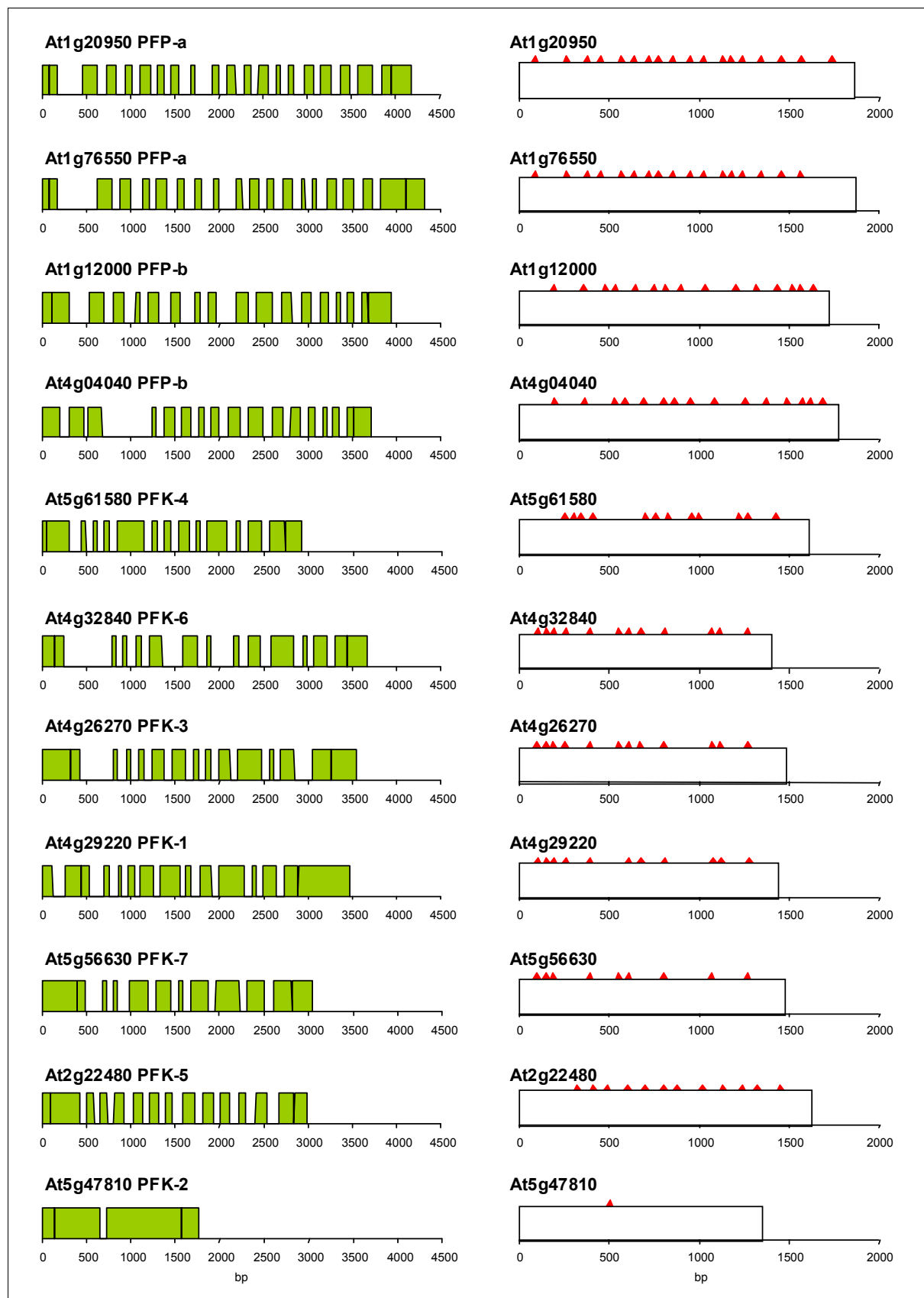


Abb. 38: Exon-Intron-Struktur der Phosphofructokinase-Gene aus *Arabidopsis*. Links: Ungeschnittene Struktur der Gene, grün sind die Exons dargestellt. Rechts: Geschnittene mRNA, die Positionen der Introns sind mit Dreiecken markiert.

Tab. 21: Liste der Phosphofructokinase-Gene aus *Arabidopsis thaliana*, Größeneigenschaften und ESTs aus der Datenbank (www.arabidopsis.org). PFK: ATP-abhängige Phosphofructokinase, PFP: PPi-abhängige Phosphofructokinase.

Name	ID	Größe der mRNA (BP)	Größe des Proteins (kDa)	plastidäres Signalpeptid	Anzahl der ESTs (Stand Juli 2005)
PFK1	At4g29220	1422	52.0	-	28
PFK2	At5g47810	1335	49.2	-	20
PFK3	At4g26270	1470	53.6	-	19
PFK4	At5g61580	1593	58.5	Ja	10
PFK5	At2g22480	1614	58.6	Ja	15
PFK6	At4g32840	1389	50.8	-	12
PFK7	At5g56630	1458	53.5	-	22
PFPa1	At1g20950	1845	67.1	-	8
PFPa2	At1g76550	1854	67.5	-	10
PFPb1	At1g12000	1701	61.4	-	63
PFPb2	At4g04040	1758	64.5	-	6

3.3.2 Klonierung der putativen PFK-Gene und Expression in Tabak-Blättern

Um die Aktivität der 7 putativen PFK-Gene nachzuweisen, wurde die mRNA aus blühenden *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert und cDNA hergestellt. Die Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in den pBinAR-Vektor (Höfgen und Willmitzer 1990) kloniert. Mit den gereinigten Plasmiden wurden Agrobakterien transformiert, die für die transiente Expression des jeweiligen Genes in Tabak-Blättern genutzt wurden. Die gesamte Klonierung wurde in Gatersleben von Christiane Börnke und Heike Deppner durchgeführt.

Zwei Tage nach Infiltration der *Agrobacterium*-Suspension in Blätter von intakten Tabak-Pflanzen wurden die Aktivitäten von PFP und PFK in Enzymextrakten gemessen. Infiltration von 4 der 7 putativen PFK-Gene (PFK 1, 3, 4, 7) ergab eine 3- bis 5fach höhere PFK-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-Plasmiden oder nicht infizierten Blättern (Tab. 22). Für PFK 2, 5 und 6 waren die Aktivitäten der PFK nur leicht erhöht. Die Aktivität der PFP war dagegen nach Infiltration mit allen Konstrukten ähnlich (Tab. 22). Tabakpflanzen, die stabil mit dem Konstrukt für die PFK3 und PFK4 transformiert worden waren, zeigten ebenfalls 4- bis 5mal höhere PFK-Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp, und unveränderte PFP-Aktivität (Biemelt, pers. Mitteilung).

Tab. 22: PFK- und PFP-Aktivität [$\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] der putativen Phosphofructokinasen in infiltrierten Tabak-Blättern. Zwei Tage nach der Infiltration von transformierten *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen in Tabak-Blätter wurden Enzym-Extrakte hergestellt und die Enzymaktivitäten gemessen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von 4 Proben.

	PFK [$\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	PFP [$\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	PFK/ PFP [rel U]
WT SNN	23.2 \pm 3.9	28.8 \pm 2.3	0.8
PFK 1	133.1 \pm 4.7	35.9 \pm 2.3	3.7
PFK 2	55.4 \pm 3.5	36.6 \pm 1.8	1.5
PFK 3	178.9 \pm 17.1	35.9 \pm 2.9	5.0
PFK 4	157.8 \pm 6.9	44.9 \pm 2.7	3.5
PFK 5	59.3 \pm 5.7	41.1 \pm 4.1	1.4
PFK 6	54.7 \pm 4.1	38.0 \pm 1.9	1.4
PFK 7	168.4 \pm 10.8	29.1 \pm 7.4	5.8
Puffer	19.7 \pm 1.6	24.8 \pm 1.2	0.8
14-3-3	25.2 \pm 2.3	28.7 \pm 1.8	0.9
L700	35.3 \pm 0.8	41.6 \pm 3.1	0.9

3.3.3 Analyse der gewebespezifischen Expression der PFK-Gene

Eine semiquantitative PCR-Analyse wurde durchgeführt, um die gewebespezifische Expression der PFK-Gene nachzuweisen. Dafür wurde RNA aus Wurzeln, jungen und ausgewachsenen Blättern, Stengeln und Blüten extrahiert. Dabei ergab sich ein differenziertes Bild der verschiedenen Isoenzyme. PFK1, PFK3, PFK4, PFK5 und PFK7 waren in fast allen untersuchten Geweben relativ stark vertreten (Abb. 39). PFK2 und PFK6 waren in den meisten untersuchten Geweben nur schwach exprimiert. Auffällig war, dass PFK7 im Vergleich zu den anderen Geweben verstärkt in den Wurzeln exprimiert wurden (Abb. 39). PFK6 zeigte sich vor allem in Blüten.

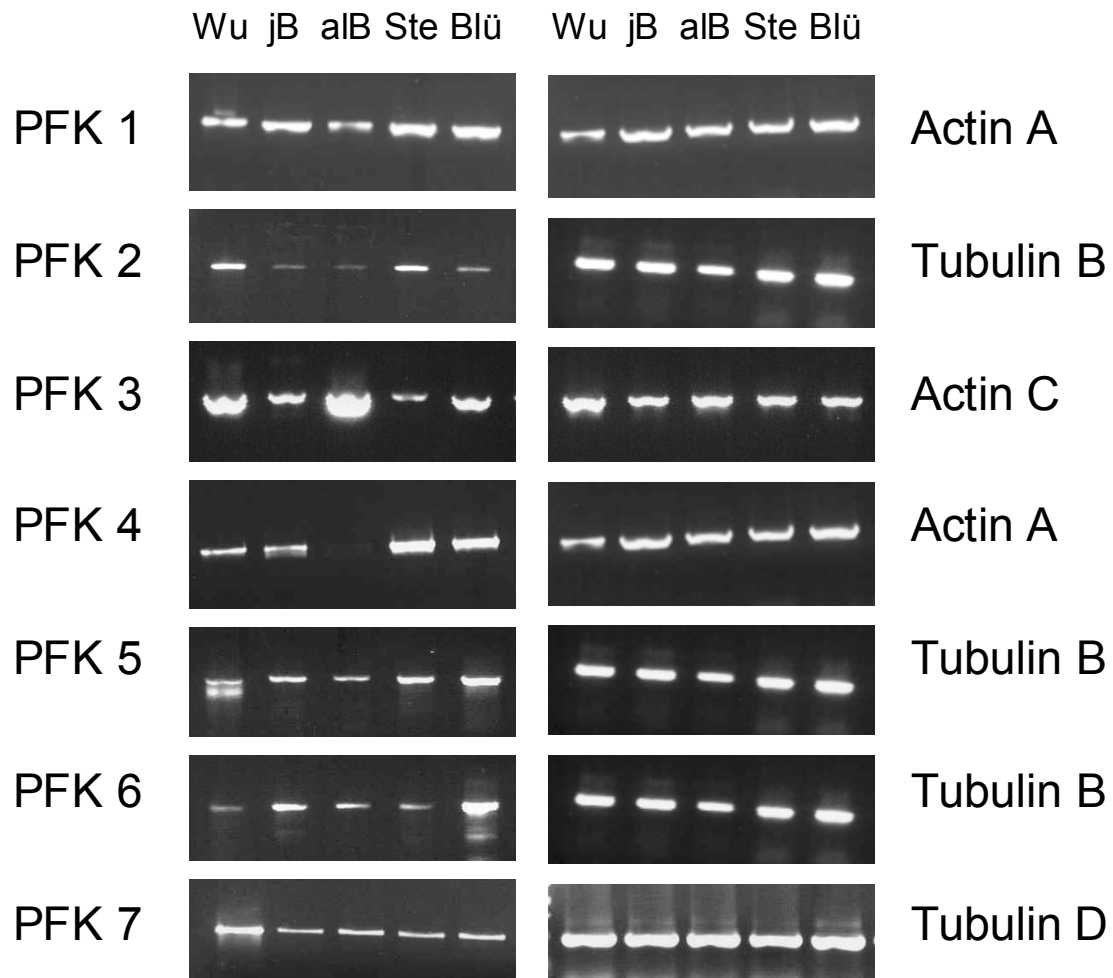


Abb. 39: Semiquantitative PCR-Analyse der 7 PFK-Gene in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis*-Pflanzen. Von 4 verschiedenen Anzuchten (A, B, C, D) wurden jeweils die Gewebe geerntet, RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die PCR für alle 7 PFKs durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis wurde jeweils ausgewählt und mit einem internen Marker (Actin oder Tubulin) zusammen gezeigt. Wu, Wurzel; jB, junges Blatt; alB, älteres Blatt; Ste, Stengel; Blü, Blüte.

4 Diskussion

4.1 Gärung als wichtiger Prozess unter Sauerstoffmangel

4.1.1 Die Höhe der Ethanol-Gärung bestimmt die Überlebensfähigkeit von jungen Pflanzen bei Anoxie in Dunkelheit

Wenn während einer Sauerstoffmangel-Periode die mitochondriale Atmung vollständig gehemmt ist, ist Glycolyse in Verbindung mit Gärung die einzige Möglichkeit, ATP zu produzieren. Es wird generell akzeptiert, dass die Fähigkeit von Pflanzen, unter Sauerstoff-Defizit Ethanol zu bilden, das Überleben solcher Stresssituationen verbessert. So wurde gezeigt, dass Pflanzen mit verminderter ADH- oder PDC-Aktivität Anoxie schlechter überleben können (Jacobs et al. 1988, Lemke-Keyes und Sachs 1989, Johnson et al. 1994, Rahman et al. 2001). Alternative Endprodukte der Gärung wie Lactat oder Malat sind bei längeren Anoxie-Perioden für die Energieproduktion von geringerer Bedeutung, da sie zusätzliche Probleme wie die cytoplasmatische Acidose verursachen (Roberts et al. 1984). Sowohl überflutungs-tolerante als auch sensitive Pflanzen sind in der Lage, Ethanol zu bilden. Wenn daher der Einfluss der Gärung auf die Überlebensfähigkeit von Pflanzen bei Überflutung untersucht werden soll, ist es erforderlich, die Menge der gebildeten Gärungsprodukte in Beziehung zum Toleranzgrad zu setzen.

In früheren Untersuchungen waren zu diesem Thema widersprüchliche Beobachtungen berichtet worden. Einige Autoren (z.B. Setter et al. 1994, Gibbs et al. 2000) beschrieben eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Gärung und der Anoxie-Toleranz in Koleoptilen unterschiedlicher Reis-Varietäten. Im Gegensatz dazu fanden Boamfa et al. (2003) keinen solchen Effekt beim Vergleich ganzer Pflanzen von zwei unterschiedlich toleranten Reis-Varietäten. Gärungsraten in Wurzeln von Reis- und Weizen-Pflanzen zeigten ebenfalls keine Unterschiede (Mustroph und Albrecht 2003). Auch wies man für sensitive Arten wie Tabak und Baumwolle nach, dass eine gentechnisch erhöhte Aktivität der Gärungsenzyme PDC und ADH die Toleranz gegenüber Anoxie deutlich verminderte (Tadege et al. 1998, Ellis et al. 2000, Rahman et al. 2001) oder erhöhte (Shiao et al. 2002, Ismond et al. 2003).

Mit Hilfe des photoakustischen Laser-Systems wurden Ethanol- und Acetaldehyd-Ausscheidungsraten von toleranten Reis- und sensitiven Weizen-Pflanzen verglichen. Dieses relativ neue System ermöglicht es erstmals, Gärungsraten von intakten ganzen Pflanzen zu bestimmen, da beide Produkte der Ethanol-Gärung sehr flüchtig sind und schnell von der

Pflanze ausgeschieden werden (Bertani et al. 1980). Während einer 20stündigen Anoxie-Periode in Dunkelheit zeigten Reis-Pflanzen eine 20mal höhere Gärungsrate als Weizen-Pflanzen (Abb. 9). Wird die Überlebensfähigkeit der Pflanzen während dieser Zeit mit einbezogen (Abb. 11A), so ist deutlich eine positive Korrelation zwischen Anoxie-Toleranz und hoher Gärungsrate zu beobachten. Es stellte sich nun die Frage, wie diese hohe Gärungsrate verursacht worden war.

4.1.2 Sprosse sind verantwortlich für eine hohe Gärungsaktivität toleranter Reis-Pflanzen

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die größte Menge des gebildeten Ethanol und Acetaldehyds in Reis-Pflanzen vom Spross produziert wurde, während Weizen-Pflanzen ähnliche Gärungsraten in Wurzeln und Sprossen zeigten (Abb. 10). Die unterschiedlichen Gärungsraten beider Sprosse waren nicht darauf zurückzuführen, dass beide Gewebe eine unterschiedliche Speicherkapazität bzw. Ausscheidungsfähigkeit für Ethanol hatten, denn auch die Menge an in den Sprossen gespeichertem Ethanol war in Reis-Pflanzen deutlich höher als in Weizen-Pflanzen (Tab. 4). Ein Experiment mit abgeschnittenen Pflanzenteilen ergab außerdem, dass zwischen Wurzeln und Sprossen kein Transport der Fermentationsprodukte stattfand, sondern diese am Synthese-Ort ausgeschieden wurden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund an krautigen Pflanzen steht im Gegensatz zu Experimenten mit Bäumen, bei denen Acetaldehyd und Ethanol von den Wurzeln in die Sprosse transportiert werden (Kreuzwieser et al. 1999, Kreuzwieser et al. 2001), was durch Unterschiede in der Leitgewebe-Anatomie beider Pflanzengruppen erklärt werden könnte.

Die Unterschiede in den Gärungsraten beider Pflanzen waren demnach im Verhalten der Sprosse begründet, während die Fermentationsraten der Wurzeln ähnlich waren, wie bereits in der Vergangenheit gezeigt wurde (Mustroph und Albrecht 2003). Um der Frage nachzugehen, wie Reis-Pflanzen im Gegensatz zu Weizen in der Lage waren, sehr große Mengen an Ethanol zu bilden, wurden die Aktivitäten der Gärungsenzyme sowie die Zuckergehalte in den unterschiedlichen Pflanzenorganen gemessen. Es zeigte sich, dass Reis-Sprosse 4mal höhere ADH- und PDC-Aktivitäten aufwiesen als Weizen-Sprosse (Tab. 3). Außerdem enthielten Reis-Sprosse bis zu 3fach höhere Zuckergehalte als Weizen, die als Substrat für die Gärung dienen können (Tab. 4). Wurzeln beider Arten dagegen enthielten zwar hohe Enzymaktivitäten, aber nur sehr geringe Zuckermengen. Wir können also davon ausgehen, dass einerseits die Enzymaktivitäten von ADH und PDC wichtig sind für die Fähigkeit zur

Fermentation, andererseits spielen auch die fermentierbaren Kohlenhydrate eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung hoher Gärungsraten.

Die großen Zucker-Mengen in Kombination mit hohen Aktivitäten der Gärungsenzyme ermöglichen es den Sprossen von Reis-Pflanzen, sauerstofffreie Perioden länger zu überleben als Weizen-Pflanzen oder als Wurzeln. Während Weizen-Blätter bereits nach 4 h Anoxie erste Blattschäden zeigten (Abb. 12C), konnten Reis-Pflanzen mehr als 12 h Anoxie ohne sichtbare Schäden überstehen. Diese Phänotypen stimmen außerdem mit den ATP-Gehalten überein. Nach 4 h Anoxie war der Abfall der ATP-Konzentration in Reis-Sprossen viel geringer als im Weizen (Tab. 5). Auch nach 24 h Anoxie enthielten Reis-Sprosse, die die höchsten Gärungsraten gezeigt hatten, noch ATP, während alle anderen Gewebe abgestorben waren. Schon früher wurde für verschiedene Reis-Varietäten beschrieben, dass große Zuckermengen im Gewebe, die ein Indikator für ein hohes Gärungs-Potential sind, mit erhöhter Überflutungs-Toleranz korrelieren (Singh et al. 2001).

Aus den gezeigten Daten kann geschlossen werden, dass Sprosse und Wurzeln zwar durch Induktion der Ethanol-Gärung prinzipiell vergleichbar auf Sauerstoffmangel reagieren, deren Toleranz unterscheidet sich aber erheblich. Auch in der Literatur wurde schon beschrieben, dass unterschiedliche Organe einer Pflanzenart unterschiedlich tolerant gegenüber Sauerstoffmangel sind (Ellis et al. 1999). Heterotrophe Wurzeln können sich im Toleranzgrad von den autotrophen Sprossen erheblich unterscheiden. Es wird generell angenommen, dass Wurzeln empfindlicher reagieren als Sprosse (Saglio et al. 1988). Als besonders Anoxie-resistente Organe gelten dagegen Koleoptilen von Reis (Menegus et al. 1991) und Sprosse von *Acorus calamus* (Schlüter und Crawford 2001).

Nicht nur die Ethanol-Daten, sondern auch die CO₂-Werte zeigen, dass Reis-Sprosse höhere Glycolyse-Raten unter Anoxie aufweisen als Weizen-Sprosse (Tab. 2). Unter der Annahme, dass bei der Ethanol-Gärung jeweils zwei Moleküle CO₂ und Ethanol pro Molekül abgebauter Hexose entstehen, im Gegensatz zu 6 Molekülen CO₂ beim aeroben Abbau, zeigten Sprosse von Reis-Pflanzen, aber nicht von Weizen-Pflanzen, einen erhöhten glycolytischen Flux, d.h. einen Pasteur-Effekt. Dafür sprechen Pasteur-Quotienten von 1.90 bzw. 0.97 (Tab. 2). Diese Daten korrelieren mit Literatur-Daten. Während sensitive Weizen-Wurzeln keinen Pasteur-Effekt aufweisen (Albrecht und Wiedenroth 1994), zeigen Anoxie-tolerante Sprosse von

Potamogeton pectinatus einen sehr starken Pasteur-Effekt und sehr hohe Gärungsraten (Summers et al. 2000).

4.1.3 Grenzen hoher Gärungsraten

Die beobachteten Unterschiede im Gärungsverhalten beider Pflanzen zeigen, dass die Ethanol-Gärung sehr wichtig für das Überleben kurzer Anoxie-Phasen ist. Es ist aber unwahrscheinlich, dass hohe Gärungsraten das Überleben der Reis-Pflanzen während langer Stress-Perioden sichern, da unter Anoxie-Bedingungen in Dunkelheit keine Kohlenhydrate neu gebildet werden können. Reis-Sprosse waren zwar in der Lage, zumindest 20 h lang eine sehr hohe Gärungsrate aufrechtzuerhalten (Abb. 9B), nach 24 h noch 30% des ATP-Gehaltes unter Belüftung zu behalten (Tab. 5) und 24 h Anoxie zu überleben (Abb. 11, Abb. 12), im Gegensatz zu Wurzeln oder Weizen-Pflanzen. Nach 24 h waren die Kohlenhydrate aber nahezu aufgebraucht (Tab. 4), und längere Anoxie kann nicht überlebt werden (Mustroph und Albrecht 2003). Ein wesentlicher limitierender Faktor der Gärung wäre somit der Kohlenhydrat-Vorrat (Barclay und Crawford 1983, Bertrand et al. 2003). Diese Annahme wurde auch bestätigt durch den Befund, dass Zufütterung mit Kohlenhydraten das Überleben von Wurzeln unter Anoxie deutlich steigern kann (Webb und Armstrong 1983, Xia und Saglio 1992, Germain et al. 1997).

Die geringen Gärungsraten im Weizen, die hauptsächlich von Enzymaktivitäten limitiert waren (Tab. 3), verbrauchten zwar nicht alle vorhandenen Zucker, waren aber ebenfalls nicht ausreichend, um 24 h Anoxie in Dunkelheit zu überleben (Abb. 11, Abb. 12), und ermöglichten nahezu keine ATP-Produktion mehr (Tab. 5). Überraschenderweise akkumulierten in Weizen-Pflanzen sogar Glucose und Fructose nach 24 h Anoxie (Tab. 4). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Abbau der Hexosen während der Glycolyse langsamer abläuft als die Saccharose-Spaltung. Es ist vorstellbar, dass am Anfang der Glycolyse die Phosphorylierung der Hexosen mit Hilfe der Hexokinasen durch geringen ATP-Gehalt gehemmt ist. Die Hexokinase-Reaktion ist einer der limitierenden Schritte der Glycolyse unter Sauerstoffmangel (Bouny und Saglio 1996, Germain et al. 1997). Außerdem benötigt die zweite Phosphorylierung des HexoseP durch die Phosphofructokinase wiederum ATP, und kann demzufolge bei Sauerstoffmangel ebenfalls gehemmt sein. Für Reis-Pflanzen dagegen kann vermutet werden, dass neben ATP auch PPi für Phosphorylierungs-Reaktionen genutzt werden könnte, da PPi-nutzende Enzyme unter Anoxie verstärkt induziert werden

(Ricard et al. 1991, Guglielminetti et al. 1995, Mertens et al. 1990, Mohanty et al. 1993, Umeda und Uchimiya 1994, Gibbs et al. 2000, Kato-Noguchi 2002).

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass eine anfangs sehr geringe Fermentationsrate im Weizen unter Anoxie in Dunkelheit zu einem drastisch verminderten ATP-Gehalt führt, der den weiteren Zuckerabbau hemmt, und dadurch den Energiemangelbedingten Zelltod schneller verursacht. Weizen ist nicht einmal dazu in der Lage, unter diesen Bedingungen die Gärungsenzyme zu induzieren, da Energie für die Protein-Biosynthese fehlt (Tab. 3). Reis-Pflanzen dagegen zeigen bereits zu Beginn der Anoxie hohe Gärungsraten, wodurch zumindest während der Glycolyse genug ATP bereitgestellt werden kann, um den Energiehaushalt der Zellen für eine gewisse Zeit aufrechterhalten zu können.

Wie schon erwähnt, reichen die Kohlenhydrat-Vorräte in wachsenden Geweben nicht aus, längere Zeiten der Anoxie zu überstehen (Tab. 4, Muströph und Albrecht 2003). Im Gegensatz zu den jungen und sich schnell entwickelnden Keimlingen von Reis und Weizen, die in dieser Studie untersucht wurden, können Teile älterer Pflanzen mehrere Wochen oder Monate Anoxie überstehen (Crawford und Brändle 1996). Zum Beispiel können Arten wie *Acorus calamus* und *Iris pseudacorus* in der winterlichen Ruhezeit mit einem großen Vorrat an Kohlenhydraten und einer möglichst geringen Metabolismus-Rate sehr lange Anoxie-Perioden überleben (Schlüter und Crawford 2001). Obwohl eine langsame Glycolyse-Rate Energiemangel verursacht, und Wachstum sowie Biosynthese stark gehemmt werden, bewahrt sie doch die Pflanzen auf lange Sicht vor einer Knappheit an Kohlenhydraten und einem Absterben bei ungünstigen Bedingungen.

4.1.4 Acetaldehyd als toxisches Zwischen-Produkt der Gärung

Acetaldehyd ist ein toxisches Produkt der Ethanol-Gärung, und schädigt Zellen durch Komplexbildung mit Proteinen und DNA, da es als Elektronendonator fungiert (Perata et al. 1992, Zhang et al. 1997). Acetaldehyd kann auch zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen durch die Xanthin-Oxidase führen (zusammengefasst in Aberle und Renn 2003, Bonini et al. 2004). Deshalb führt Acetaldehyd-Akkumulation in Zellen zu Membranschäden (Leprince et al. 2000, Pavelic et al. 2000). Normalerweise werden hohe Mengen an Acetaldehyd während der Anoxie dadurch vermieden, dass die Aktivität der ADH vielfach höher ist als die der PDC. Dennoch konnte beobachtet werden, dass kurz nach Beginn der Anoxie-Phase beide Pflanzen zunächst Acetaldehyd ausschieden, während die

Ethanol-Bildung 20 min später erfolgte (Abb. 9, Abb. 10). Auch in anderen Arbeiten wurde eine Acetaldehyd-Produktion unter Anoxie beschrieben (Pfister-Sieber und Brändle 1994, Boamfa et al. 2003).

Besonders im Weizen war eine zeitweise stark erhöhte Acetaldehyd-Ausscheidung in der ersten Stunde der Anoxie zu messen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass zu Beginn der Stress-Phase die *in planta*-Aktivität der ADH noch nicht ausreichend hoch war, um aus Acetaldehyd Ethanol zu bilden. Die Aktivität der ADH in Reis-Sprossen war dagegen 10fach höher als die in Weizen-Sprossen und konnte so einen Acetaldehyd-Peak vermeiden. Auch in Wurzeln beider Pflanzen waren die ADH-Aktivitäten ausreichend hoch, um starke Acetaldehyd-Bildung zu verhindern (Tab. 3). Bei längerer Anoxie allerdings produzierten Reis-Pflanzen mehr Acetaldehyd als Weizen-Pflanzen (Abb. 9, Abb. 10). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Ethanol-Gärungsrate im Reis generell sehr viel höher ist als im Weizen. Während z.B. nach 3 h Anoxie Weizen 5mal mehr Ethanol als Acetaldehyd produzierte, schied Reis 16mal mehr Ethanol als Acetaldehyd aus. Somit kann Reis Acetaldehyd-Bildung prozentual besser vermeiden als Weizen.

Die Wiederzufuhr von sauerstoffhaltiger Luft führte in beiden Pflanzenarten ebenfalls zur Ausscheidung großer Mengen von Acetaldehyd (Abb. 20). Dies wurde schon mehrfach beobachtet (Cossins 1978, Monk et al. 1987, Zuckermann et al. 1997, Boamfa et al. 2003). Verursacht werden kann die post-anoxische Acetaldehyd-Bildung auf zwei Wegen: Zum einen wird eine H_2O_2 -abhängige, CAT-kontrollierte Peroxidation von Ethanol diskutiert (Gleichung {2}, Zuckermann et al. 1997). Zum anderen ist eine NAD-abhängige, ADH-katalysierte Oxidation von Ethanol denkbar (Gleichung {3}, Monk et al. 1987). Nach Zuckermann et al. (1997) ist ersterer Weg die Hauptquelle von Acetaldehyd, zumal Wiederbelüftung auch zur vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen wie H_2O_2 führt (Monk et al. 1987, Yu und Rengel 1999, Biemelt et al. 2000, Blokhina et al. 2001, Ella et al. 2003, Garnczarska und Bednarski 2004).

Acetaldehyd wurde bei Wiederbelüftung wiederum hauptsächlich in Sprossen und kaum in Wurzeln gebildet (Abb. 21). Dies kann damit erklärt werden, dass Sprosse deutlich mehr Ethanol, der zu Acetaldehyd oxidiert werden könnte, akkumulieren als Wurzeln (Tab. 4). Somit ist in Wurzeln kein Substrat für die Acetaldehyd-Produktion vorhanden. Im Vergleich der Arten zeigten Reis-Pflanzen nach Wiederbelüftung eine geringere Acetaldehyd-

Ausscheidung als Weizenpflanzen (Abb. 20, Abb. 21), obwohl sie deutlich mehr Ethanol im Gewebe akkumulierten (Tab. 4). Dies könnte darin begründet liegen, dass Reis unter Anoxie und bei Wiederbelüftung die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) induziert (Nakazono et al. 2000, Tsuji et al. 2003). Durch dieses Enzym könnte Acetaldehyd abgebaut und eine Akkumulation verhindert werden. In Varietäten von *Echinochloa crus-galli* korrelierte eine höhere ALDH-Aktivität mit höherer Anoxie-Toleranz (Fukao et al. 2003).

Die gebildete Acetaldehyd-Menge bei Wiederbelüftung steigerte sich mit zunehmender Dauer der vorangegangenen Anoxie-Phase. So war die Anhäufung an Acetaldehyd nach 4 h Anoxie größer als nach 2 h (Abb. 22A, B, D, E). Dies galt für Weizen und für Reis. Diese Korrelation wurde schon von Boamfa et al. (2003) für Reis-Pflanzen beschrieben. Begründet liegen könnte dieser Befund darin, dass durch längere Anoxie auch mehr Ethanol im Gewebe angehäuft wird, der zu Acetaldehyd umgewandelt werden kann. Nach 28 h Anoxie allerdings zeigten nur Reis-Pflanzen eine weitere Steigerung der post-anoxischen Acetaldehyd-Produktion (Abb. 22C), Weizen dagegen produzierte nach 30 h Anoxie nur noch eine sehr geringe Menge Acetaldehyd (Abb. 22F), obwohl noch Ethanol im Gewebe vorhanden war (Tab. 4). Dies lässt darauf schließen, dass Weizen-Pflanzen, die nahezu abgestorben waren, selbst diese Reaktion nicht mehr ausführen konnten, verursacht auch durch extrem geringe ADH-Aktivitäten in den Blättern (Tab. 3).

Belichtung führte sowohl unter Anoxie als auch in der post-anoxischen Periode zu einer etwa 30fachen Verringerung der Acetaldehyd-Produktion (Abb. 20), wie schon einmal für Reis-Pflanzen beschrieben (Boamfa et al. 2003). Dies wird zum einen dadurch verursacht, dass die Fermentationsrate bei Belichtung generell geringer ist als in Dunkelheit (Abb. 14, Abb. 16). Da aber die Ethanol-Bildung im Licht nur 5fach (Weizen) bzw. 15fach (Reis) geringer war als in Dunkelheit (Abb. 20), müssen auch andere, lichtabhängige Prozesse die Acetaldehyd-Akkumulation verringern. Eventuell könnte die ADH-Aktivität durch Licht positiv beeinflusst werden, so dass Acetaldehyd-Bildung verringert werden könnte. Genauere Daten dazu liegen aber noch nicht vor.

4.2 Belichtung und Photosynthese

4.2.1 Belichtung während der Anoxie verringert die Gärungsrate in Sprossen und verbessert das Überleben der Pflanzen

Herrscht während der Anoxie-Periode Dunkelheit, ist die Glycolyse die einzige Energiequelle. Wegen der limitierenden Kohlenhydrate überleben junge Pflanzen diese Situation nicht länger als 24 h. Es konnte aber gezeigt werden, dass Belichtung während der Anoxie das Überleben von Pflanzen erheblich verbessert (Mustroph und Albrecht 2003). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet. Belichtung während der Anoxie ermöglichte es Reis und Weizen, mindestens 24 h zu überleben (Abb. 11, Abb. 12). Dies führte zu der Frage, welche Licht-abhängigen Stoffwechsel-Prozesse unter Anoxie für das bessere Überleben verantwortlich sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben, dass Belichtung während der Anoxie-Phase die Ethanol-Emission der Sprosse beider Pflanzenarten um etwa 70% verminderte, und die Acetaldehyd-Bildung nahezu vollständig hemmte (Abb. 10 vs. Abb. 16). Außerdem gaben die Sprosse weniger CO₂ ab als bei Dunkelheit (Tab. 2, Tab. 6). Da auch die Ethanol-Akkumulation im Spross-Gewebe beider Arten im Licht (Tab. 8) geringer war als im Dunkeln (Tab. 4), zeigen diese Daten, dass die Ethanol-Gärung im Licht deutlich niedriger war. Eine vergleichbare Beobachtung wurde von Boamfa et al. (2003) für Reis-Pflanzen beschrieben. Die lichtbedingte Verminderung der anaeroben Gärung geschah, obwohl die fermentativen Enzyme im Licht (Tab. 7) sogar stärker induziert wurden als in Dunkelheit (Tab. 3).

Trotz der Verminderung der Gärungsaktivität während der Anoxie durch Belichtung war, dem besseren Überleben der Pflanzen entsprechend, der ATP-Gehalt der Sprosse im Licht (Tab. 9) deutlich höher als in Dunkelheit (Tab. 5). In Weizen-Wurzeln dagegen war der ATP-Gehalt unter diesen Bedingungen nicht wesentlich höher als in Dunkelheit. Dieser Befund steht in Übereinstimmung zu anderen Versuchen, in denen Wurzeln bei Überflutung nicht von lichtabhängigen Prozessen profitieren (Clevering et al. 1995, Nabben et al. 1999). Während in Weizen-Wurzeln kein Einfluss des Lichtes auf das Gärungsverhalten zu finden war, und diese daher auch im Licht nach 24 h Anoxie nur sehr geringe ATP-Gehalte aufwiesen, zeigten Reis-Wurzeln bei Belichtung (Abb. 16D) 5fach höhere Gärungsraten als in Dunkelheit (Abb. 10D), und enthielten nach 24 h Anoxie noch etwa 30% der belüfteten ATP-Menge (Tab. 9). Eventuell könnte dies durch höhere Zuckertransport-Raten vom Spross in die Wurzeln

verursacht worden sein, bedingt durch eine bessere Energieversorgung, denn die Transportvorgänge im Phloem werden während einer Sauerstoffmangel-Periode durch Energiemangel gehemmt (Dongen et al. 2003).

Besonders für Weizenpflanzen konnte gezeigt werden, dass Belichtung das Überleben von 20 h Anoxie erheblich verbesserte, während der Effekt für Reis-Pflanzen wegen der generell besseren Toleranz geringer war. Es wurde außerdem für Weizen-Pflanzen beobachtet, dass anoxische Inkubation im Licht das Gärungsvermögen in nachfolgender Dunkelheit erhöhte (Abb. 14). Nach 8 h Anoxie mit Belichtung konnten Weizen-Pflanzen im Dunkeln 3mal mehr Ethanol bilden als bei kontinuierlicher Dunkelheit. Im Gegensatz dazu produzierten Reis-Pflanzen unter beiden Bedingungen gleich hohe Mengen an Ethanol. Dieser Unterschied im Weizen wurde dadurch verursacht, dass in den Sprossen bei belichteter Anoxie die Gärungsenzyme ADH und PDC 2fach induziert werden konnten (Tab. 7), während in Dunkelheit keine Induktion stattfand (Tab. 3). Reis zeigte generell höhere ADH- und PDC-Aktivitäten.

Die stärkere Induktion der Gärungsenzyme im Licht im Vergleich zur Dunkelheit kann zum einen daran liegen, dass Weizen bei Anoxie in Dunkelheit so wenig ATP enthält (Tab. 5), dass keine Protein-Neusynthese mehr stattfinden kann. Zum zweiten könnte Licht ein Faktor sein, der für die Neusynthese der PDC benötigt wird. Für bestimmte Anoxie-induzierbare Promotoren wurde beschrieben, dass Licht für deren Aktivierung nötig ist. Für den Promotor einer GAPDH im Mais, den GapC4-Promotor, wurde gezeigt, dass er zwar streng Anoxie-abhängig ist, aber für die Aktivierung auch Licht benötigt (Kohler et al. 1995, Geffers et al. 2000, Hänsch et al. 2003).

4.2.2 Reis ist auch im Licht toleranter gegenüber Anoxie als Weizen

Es wurde zwar gezeigt, dass im Licht die Fermentationsrate unter Anoxie geringer ist als in Dunkelheit. Dennoch zeigten Reis-Pflanzen eine 18fach höhere Gärungsrate als Weizenpflanzen (Abb. 14, Abb. 16). Dies wurde aber, anders als bei Dunkelheit, sowohl vom Spross als auch von der Wurzel verursacht (Abb. 16). Diese Unterschiede wurden wiederum dadurch bewirkt, dass Reis deutlich mehr Zucker als Weizen enthielt, und auch höhere ADH- und PDC-Aktivitäten aufwies (Tab. 7, Tab. 8). Nach diesen Ergebnissen würde Fermentation auch unter Anoxie im Licht eine wesentliche Bedeutung für die Anoxie-Toleranz haben. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass die Photosynthese-Leistung,

insbesondere die ETR, in beiden Pflanzenarten in den ersten Stunden der Anoxie ähnlich niedrig war, und wahrscheinlich nicht die Ursache für Unterschiede im Überleben zwischen Reis und Weizen war (Abb. 19).

Als Konsequenz der höheren Gärungsrate der Reis-Pflanzen zeigte sich, dass sowohl das sichtbare Schadensbild nach Anoxie und Wiederbelüftung im Reis geringer war als im Weizen (Abb. 11, Abb. 12), als auch die ATP-Gehalte nach 24 h Anoxie im Reis deutlich höher waren (Tab. 9). So wiesen Reis-Sprosse, die bei belichteter Anoxie im Vergleich zu den anderen Organen die höchsten Gärungsraten zeigten (Abb. 16), ATP-Gehalte auf, die sich nicht signifikant von der belüfteten Kontrolle unterschieden.

Diese Ergebnisse werden auch von den Photosynthese-Daten nach Anoxie unterstützt. Das Potential für eine aerobe Photosynthese blieb im Reis länger erhalten als im Weizen, und konnte während der Wiederbelüftung auch besser regenerieren (Abb. 17, Abb. 18). Dies wurde für alle gemessenen Parameter gezeigt. Trotzdem resultierte eine längere Anoxie-Phase in einem klaren Abfall der Quantenausbeuten der CO₂-Fixierung (Φ_{CO_2}) und der ETR in Reis- und Weizen-Pflanzen. Dies könnte dadurch verursacht worden sein, dass generell der Biosynthese-Stoffwechsel während der Anoxie herunterreguliert ist, um bei dem herrschenden ATP-Mangel Energie zu sparen, und so die Neusynthese von Proteinen des Photosynthese-Apparates gehemmt wird. Die Verringerung des Biosynthese-Stoffwechsels ermöglicht es den Pflanzen, den AEC im physiologischen Rahmen zu halten (Tab. 9).

Außerdem kann die geringe Photosynthese-Rate nach Anoxie dadurch verursacht worden sein, dass sich die Stomata infolge von Anoxie-bedingten Wurzel-Schäden schlossen und so zu CO₂-Mangel führten (Jackson et al. 2003). Außerdem könnte oxidativer Stress bei der Wiederbelüftung den Photosynthese-Apparat geschädigt haben (Schlüter und Crawford 2003). Auch für *Acorus calamus*, *Iris pseudacorus* und *Vaccinium macrocarpon* wurde gezeigt, dass nach einer längeren Anoxie-Periode die Photosynthese-Leistung gehemmt war (Schlüter und Crawford 2001, Schlüter und Crawford 2003). Der Chlorophyll-Gehalt war aber in den hier gezeigten Experimenten nicht Ursache der Hemmung der Photosynthese, da diese Mengen auch nach 24 h Anoxie relativ stabil waren (Tab. 10).

4.2.3 Inwieweit funktioniert die Photosynthese unter Anoxie?

Mit den eben diskutierten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Belichtung während der Anoxie eine Verminderung der Ethanol-Ausscheidung ebenso bewirkte (Abb. 14) wie einen verringerten Ethanol-Gehalt im Gewebe (Tab. 8). So wurde von Reis-Sprossen im Licht 3mal weniger Ethanol produziert als in Dunkelheit (Abb. 9, Abb. 14). Der anoxische Abbau der Kohlenhydrate war dagegen im Licht im Vergleich zur Dunkelheit im Reis-Sprossen nur um 10% vermindert, in Weizen-Sprossen sogar um 20% erhöht (Tab. 23). Außerdem sind geringe Mengen an photosynthetisch produzierten Kohlenhydraten nicht auszuschliessen, die ebenfalls in die Bilanz eingehen.

Tab. 23: Kohlenhydrat-Abbau in Sprossen und Wurzeln von Reis- und Weizen-Pflanzen während 24ständiger Anoxie im Licht und in der Dunkelheit. Die Werte sind Tab. 4 und Tab. 8 entnommen. Summe der Kohlenhydrate = Glc+Fru+Suc+Stärke [in Glc-einheiten, mg * g FW⁻¹]. KH, Kohlenhydrate

		Summe der unter Anoxie	
		Summe der KH-Gehalte	abgebauten KH
Reis			
Spross	0 h A	8.79	
	1 d A Licht	2.18	6.61
	1 d A Dunkel	1.47	7.31
Wurzel	0 h A	1.29	
	1 d A Licht	0.45	0.84
	1 d A Dunkel	0.21	1.08
Weizen			
Spross	0 h A	4.26	
	1 d A Licht	1.66	2.60
	1 d A Dunkel	2.13	2.13
Wurzel	0 h A	1.25	
	1 d A Licht	0.29	0.96
	1 d A Dunkel	0.24	1.01

Es ist also wahrscheinlich, dass andere Zucker-verbrauchende Prozesse im Licht unter Anoxie aktiv sind. Neben Kohlenhydrat-verbrauchenden Biosynthese-Prozessen, die keine Energie liefern, z.B. der Synthese der ANPs, scheinen auch energieliefernde Kohlenhydrat-abbauende Prozesse unter Anoxie im Licht abzulaufen. Diese führen dazu, dass die ATP-Gehalte in Reis- und Weizen-Blättern während der belichteten Anoxie deutlich höher sind als in Dunkelheit (Tab. 5 vs. Tab. 9). Vorstellbar wäre zum einen aerobe Respiration, die eventuell

photosynthetisch produzierten Sauerstoff nutzen könnte. Zum anderen können neben der linearen Photosynthese weitere lichtabhängige ATP-liefernde Prozesse vermutet werden.

Trotz der Vorstellung, dass Photosynthese unter Anoxie Sauerstoff produziert, der für die mitochondriale Atmung genutzt werden könnte (z.B. Waters et al. 1989, Schlüter und Crawford 2001, Rolletschek et al. 2003), wurde in den hier gezeigten Experimenten keine Netto-Photosynthese-Aktivität beobachtet. Weder wurde eine CO₂-Aufnahme (Tab. 6), noch eine Sauerstoff-Abgabe (Abb. 15) unter belichteter Anoxie gemessen. Auch war der photosynthetische Elektronentransport zwischen PSII und PSI in beiden Pflanzen unter Anoxie auf 15% des belüfteten Wertes reduziert (Abb. 19). Diese Daten lassen darauf schließen, dass der „normale“ photosynthetische Elektronentransport unter Anoxie deutlich gehemmt ist. Dies wurde auch für verschiedene C₃-Pflanzen (*Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., und *Helianthus annuus* L., Farineau 1999) sowie Mais-Chloroplasten (Ivanov und Edwards 2000) gezeigt.

Diese Beobachtungen können zwei Ursachen haben. Einmal ist davon auszugehen, dass das Substrat für den Calvin-Zyklus, das CO₂, im Stickstoff-Strom nicht vorhanden ist. Dies führt zu einem Mangel an CO₂ im Calvin-Zyklus, und verursacht so einen Rückstau von NADPH, der wiederum die gesamte Elektronentransportkette und auch die Wasserspaltung hemmt. Dies führt zur Aktivierung von Schutzmechanismen, die zur Dissipation von überschüssig absorbierter Energie führen, und so Schädigungen des Photosyntheseapparates abschwächen können. Erwähnt sei hier der Xanthophyll-Zyklus. Hier fand sich nach 24 h Anoxie im Licht eine nahezu vollständige Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin, was sich in einem hohen DEPS äußerte (Tab. 10). De-Epoxidation kommt z.B. dann vor, wenn exzessives Licht herrscht (Demmig-Adams und Adams 1996). Unter Anoxie wird außerdem die Epoxidation von Zeaxanthin während der Nacht-Phase durch das Fehlen von Sauerstoff gehemmt, was eine Regeneration des Systems verhindert.

Zum zweiten wird NAD(P)H deswegen akkumuliert, weil der Redoxzustand der gesamten Pflanzenzelle unter Anoxie überreduziert ist. Chloroplasten und Mitochondrien sind zwar autonome Organellen in Pflanzenzellen, es wurde aber schon häufig beschrieben, dass sie sich gegenseitig regulieren, und außerdem verschiedene Metabolite untereinander und mit dem Cytosol austauschen (Höfnagel et al. 1998, Raghavendra und Padmasree 2003, Van Lis und Atteia 2004, Fernie et al. 2004). Es werden vor allem ATP, Reduktionsäquivalente und

Kohlenstoff ausgetauscht (zusammengefasst in Höfnagel et al. 1998). Zu den beteiligten Transportprozessen gehören der Glycolat/ Glycerat-Shuttle, der TrioseP-Shuttle, der Malat/ Oxalacetat-Shuttle und der α -Ketoglutarat/ Glutamat-Shuttle. So kann über den TrioseP-Shuttle und den Malat-Shuttle NADH zwischen den verschiedenen Kompartimenten transportiert werden (Höfnagel et al. 1998). Eine Akkumulation von NADH in Mitochondrien durch Hemmung der mitochondrialen Atmung führt deswegen auch im Chloroplasten zur NAD(P)H-Anhäufung. Alternative Schutzmechanismen der Zelle vor zuviel NAD(P)H wie Photorespiration (Wingler et al. 2000), Mehler-Reaktion (Heber 2002) oder mitochondrialer alternativer Oxidase (Millenaar und Lambers 2003) können ohne Sauerstoff ebenfalls nicht ablaufen.

Wie bereits erwähnt, könnte CO_2 -Mangel unter Anoxie eine Ursache für eine Hemmung der Photosynthese sein. Diese Hypothese wurde auch von Jackson und Ram (2003) aufgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass Zugabe eines CO_2 -freisetzenden Puffers in die Nährlösung den Elektronentransport unter Anoxie zumindest teilweise aufrechterhalten konnte (Abb. 19). Positive Auswirkungen einer Bicarbonat-Gabe auf die anaerobe Photosynthese in *Chlamydomonas*-Zellen wurden schon früher beobachtet (Sundby 1990). Auch bei höheren Pflanzen hat Bicarbonat einen positiven Effekt während einer Überflutungsperiode. So erhöhte dies die Photosynthese-Leistung in *Potamogeton*-Blättern (Frostchristensen und Sandjensen 1995), und verbesserte das Überleben von überfluteten Reis-Pflanzen (Krishnan und Ramakrishnayya 1999). Durch den überreduzierten Redoxzustand der anoxischen Zellen ist aber eine vollständige Aufhebung der Photosynthese-Hemmung durch CO_2 -Zugabe nicht zu erwarten.

Die Hemmung der PSII-Aktivität unter den verwendeten, Sauerstoff- und CO_2 -freien Bedingungen legt nahe, dass auch bei belichteter Anoxie kaum Sauerstoff durch die Wasserspaltung freigesetzt wird, und für die Atmung verwendet werden könnte. Dies lässt darauf schließen, dass statt der mitochondrialen Atmung andere lichtabhängige, ATP-bildende und Zucker-verbrauchende Prozesse aktiv sind, um das Überleben der Pflanzen unter Anoxie zu sichern. Für *Chlamydomonas* wurde eine Hypothese zur anaeroben Photosynthese aufgestellt (Bendall und Manasse 1995). Während der Anoxie ist auch bei *Chlamydomonas* die PSII-Aktivität gehemmt (Antal et al. 2003). Es wird aber angenommen, dass ein zyklischer Elektronentransport um PSI herum stattfinden könnte.

In der Vergangenheit sind zwei mögliche Mechanismen des zyklischen Elektronentransportes beschrieben worden (zusammengefasst in Peltier und Cournac 2002). Zum einen können die Elektronen vom Ferredoxin über eine Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase zurück in den Plastochinon-Pool überführt werden (blaue Pfeile in Abb. 40). Zum anderen wurde vor einiger Zeit ein zweiter Weg beschrieben (Ravenel et al. 1994), bei dem Elektronen von NADPH über ein System aus Transhydrogenase und plastidärer NAD(P)H-Dehydrogenase (NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreductase-Komplex, NDH) zurück in den Plastochinon-Pool gelangen (rote Pfeile in Abb. 40). Außerdem könnten Protonen in Form von NADH aus Mitochondrien über den NDH-Komplex in den plastidären Plastochinonpool eingespeist werden (Antal et al. 2003, Posewitz et al. 2004). In *Chlamydomonas*-Zellen unter Anoxie soll vorrangig der zweite Weg des zyklischen Elektronentransportes ablaufen (Antal et al. 2003).

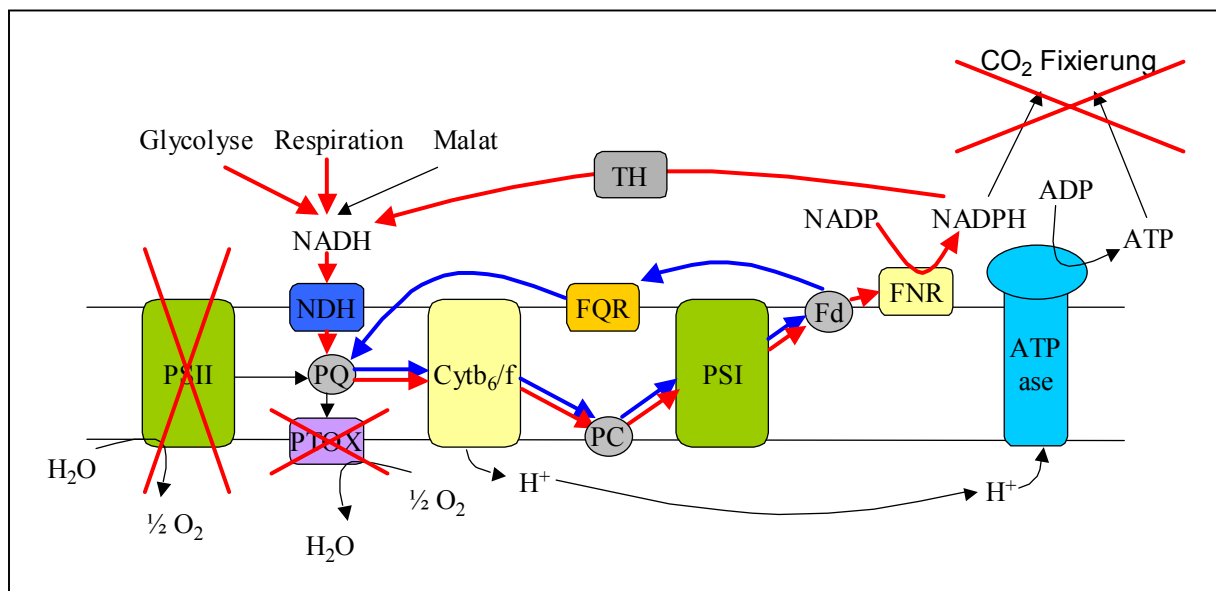


Abb. 40: Modell für den zyklischen Elektronentransport (in Anlehnung an Peltier und Cournac 2002). Mit blauen Pfeilen wurde der herkömmliche Elektronentransport gekennzeichnet. Mit roten Pfeilen wurde der putative anaerobe Elektronentransport markiert. Rot durchgestrichen sind Prozesse, die unter Anoxie stark gehemmt sind. ATPase, Protonen-pumpende ATP-Synthase; Cytb₆/f, Cytochrom-b₆/f-Komplex; Fd, Ferredoxin; FNR, Ferredoxin-NADP-Reduktase; FQR, Ferredoxin-Chinon-Reduktase; NDH, NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreductase-Komplex; PC, Plastocyanin; PQ, Plastochinon; PSI, Photosystem I; PSII, Photosystem II; PTOX, plastidäre terminale Oxidase; TH, putative Transhydrogenase.

Ein ähnlicher Mechanismus könnte in Pflanzen existieren. Zyklischer Elektronentransport war unter aeroben Bedingungen bisher nur in C₄-Pflanzen messbar. Unter Anoxie war eine zyklische Elektronentransport-Aktivität aber auch in C₃-Pflanzen nachweisbar (Haldimann und Strasser 1999, Joet et al. 2002, Garstka et al. 2004). Die abgebauten, aber nicht für die Gärung verwendeten Zucker könnten das NADH liefern, welches das System über die NDH

antreiben könnte. Hinweise auf eine Bedeutung des NDH-Komplexes für den zyklischen Elektronentransport unter Anoxie liefern Experimente mit Tabak-Mutanten, denen eine aktive NDH fehlt, und deren zyklischer Elektronentransport unter Anoxie gehemmt ist (Joet et al. 1998).

Ein zyklischer Elektronentransport könnte den Pflanzen das benötigte ATP liefern. Da dieser Mechanismus über das NADH Zucker-abhängig ist, könnten die Unterschiede in der Anoxie-Toleranz zwischen Reis und Weizen eventuell auch durch die unterschiedlichen Zucker-Gehalte verursacht werden (Tab. 8). Sie beruhen wahrscheinlich nicht auf Unterschiede in der Elektronentransport-Rate, da diese bei beiden Pflanzen, zumindest in den ersten 6 h, vergleichbar ist (Abb. 19). Die Zucker-Abhängigkeit des zyklischen Elektronentransportes führt aber auch dazu, dass das System nicht zur Überdauerung längerer Anoxie-Perioden geeignet ist, da die Zucker schon nach 24 h nahezu verbraucht waren.

Das hier diskutierte System könnte eine Möglichkeit der Energiegewinnung unter Anoxie sein. Allerdings bleiben noch einige Fragen offen. So ist noch unbekannt, worauf die vom NADH eingespeisten Protonen übertragen werden. Außerdem fehlen Erkenntnisse darüber, ob und in welchem Maß der Calvin-Zyklus unter Anoxie funktioniert.

4.3 Die Rolle von PPi in der Glycolyse unter Sauerstoffmangel

Seit einiger Zeit wird vermutet, dass PPi bei ATP-Mangel eine Funktion als alternativer Energiedonor haben könnte (Stitt 1998). Um die Rolle von PPi für den Stoffwechsel von Kartoffel-Pflanzen unter Sauerstoffmangel zu untersuchen, wurden transgene Pflanzen mit einem verminderten cytosolischen PPi-Gehalt auf ihre Reaktionen auf Hypoxie hin untersucht und mit Wildtyp-Pflanzen verglichen.

4.3.1 Ein Mangel an PPi beeinflusst die Saccharose-Spaltung negativ

Die Expression einer PPase von *E. coli* im Cytosol von Kartoffelpflanzen resultierte in einer dramatischen Veränderung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in transgenen Kartoffel- und Tabak-Pflanzen (Sonnewald 1992, Jelitto et al. 1992). Für diese Pflanzen wurde gezeigt, dass sich lösliche Zucker im Gegensatz zu Stärke anreichern, und damit die Verteilung der Photoassimilate verändert wird (Sonnewald 1992). Während transgene Tabak-Pflanzen eine deutliche Hemmung des Wachstums zeigten, war der Effekt der PPase-Expression unter der Kontrolle des gewöhnlichen CaMV 35S-Promotor auf das Wachstum von Kartoffelpflanzen geringer (UPPaI, Sonnewald 1992). Pflanzen, die das PPase-Gen unter Kontrolle des chimären STLS/CaMV 35S-Promotors exprimierten (UPPa II, Hajirezaei und Sonnewald 1999), zeigten aber ebenfalls ein deutlich vermindertes Wachstum. Neben den Veränderungen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in Blättern war auch der sink-Stoffwechsel der Kartoffel-Knollen sowie deren Keimung durch die PPase-Expression gestört (Jelitto et al. 1992, Hajirezaei und Sonnewald 1999). Letztere Autoren zeigten, dass die Stärkeakkumulation in den transgenen Knollen gehemmt war, während vor allem Saccharose akkumulierte. Dies läßt auf eine gestörte Saccharose-Nutzung schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk auf die Reaktionen der Wurzeln gelegt, da hauptsächlich diese in der Natur von Sauerstoffmangel betroffen sind. Deswegen wurden die Pflanzen in belüfteter Hydrokultur angezogen. Auch unter diesen Bedingungen war das Wachstum der Pflanzen, wie schon für Erdkultur beschrieben (Hajirezaei und Sonnewald 1999), geringer als im Wildtyp (Tab. 15). In Übereinstimmung mit den früheren Ergebnissen aus Kartoffel-Knollen konnten wir zeigen, dass durch den PPi-Mangel hauptsächlich die Saccharose-Spaltung in den Wurzeln transgener Pflanzen gehemmt war. Eine Überexpression der PPase verursachte in den Wurzeln der UPPa II-2-Pflanzen eine Akkumulation von UDPGlc, während die Menge an Glc6P und Fru6P stark vermindert war (Tab. 12). Dies wurde auch für Kartoffel-Knollen beschrieben (Jelitto et al. 1992, Geigenberger et al. 1998,

Hajirezaei und Sonnewald 1999). Ebenso verminderten sich die Mengen an Fru1,6BP und 3PGA in allen untersuchten Geweben. Jedoch fanden die Autoren auch erhöhte Saccharose-Gehalte und erhöhte SuSy-Aktivitäten in den Knollen transgener Kartoffel-Pflanzen (Geigenberger et al. 1998), was hier für die Wurzeln nicht beobachtet werden konnte (Tab. 12, Tab. 14). Dennoch sprechen die Daten dafür, dass die Saccharose-Spaltung und der weitere Abbau in der Glycolyse infolge des Mangels an PPi auch in den Wurzeln behindert war. Die Netto-Glycolyse-Rate der Wurzeln unter belüfteten Bedingungen war allerdings nicht verändert (Abb. 29). Ein verminderter ATP-Gehalt und eine geringere Wachstumsrate der Wurzeln sprechen allerdings dafür, dass der Energiehaushalt der Wurzeln durch das Fehlen von PPi gestört ist. Invertasen könnten in den transgenen Pflanzen unter belüfteten Bedingungen die Funktion der SuSy übernehmen, um die Glycolyse-Rate aufrechtzuerhalten, würden aber auch mehr Energie verbrauchen (Schema siehe Abb. 5).

Während einer Behandlung mit Sauerstoffmangel ist die mitochondriale Atmung stark eingeschränkt oder völlig gehemmt. Dies hat negative Auswirkungen auf den Energie-Stoffwechsel und das Wachstum der Pflanzen (zusammengefasst z.B. bei Gibbs und Greenway 2003). Der PPi-Gehalt der Wurzeln wurde aber durch eine Hypoxie-Periode nicht signifikant beeinflusst (Tab. 12). Dies wurde auch schon für andere Pflanzen und unterschiedliche Sauerstoffmangel-Bedingungen gezeigt (Dancer und ap Rees 1989, Mohanty et al. 1993, Geigenberger et al. 2000). Dagegen nahm der ATP-Gehalt stark ab (Tab. 12). Um wenigstens die Glycolyse aufrechterhalten zu können, werden die Enzyme der Ethanol-Gärung bei Hypoxie induziert (Tab. 14). Obwohl dies geschieht, und die Fähigkeit zur Ethanol-Produktion vorhanden ist (Abb. 25, Abb. 29B), akkumulierten Kohlenhydrate in den Wurzeln der Kartoffelpflanzen. Ähnliche Beobachtungen wurden schon früher für Hypoxie-Bedingungen beschrieben (Atwell et al. 1985, Setter et al. 1987, Albrecht et al. 1993, Biemelt et al. 1999, Mustroph und Albrecht 2003). Verursacht wird diese Zucker-Anhäufung eventuell dadurch, dass zwar die Photosynthese in den anfangs nicht betroffenen Blättern weiter abläuft und Zucker liefern kann, das Wachstum und der Stoffwechsel der Wurzeln aber deutlich gehemmt ist (Mustroph und Albrecht 2003).

Unter Hypoxie akkumulierten Wurzeln transgener Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp mehr Saccharose (Tab. 12), wie es für Kartoffel-Knollen schon unter belüfteten Bedingungen beschrieben wurde. In letzter Zeit wurde berichtet, dass in Knollen und Samen durch das kompakte Gewebe häufig geringe Sauerstoff-Konzentrationen herrschen (Geigenberger et al.

2000, Dongen et al. 2003, Rolletschek et al. 2003), wodurch diese empfindlichere Reaktion der Knollen erklärbar wäre. Wird diese Saccharose-Anhäufung im Zusammenhang mit der auch unter Hypoxie sichtbaren Akkumulation von UDPGlc und der Verminderung des HexoseP-Pools in transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp betrachtet (Tab. 12), so kann daraus geschlossen werden, dass der Saccharose-Abbau durch den PPi-Mangel gehemmt ist, und zwar stärker als unter belüfteten Bedingungen. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass in den transgenen Pflanzen die SuSy-Aktivität unter Hypoxie weniger stark induziert wird als in Wildtyp-Pflanzen (Tab. 14). Eine Kompensation der geringen SuSy-Aktivität durch die Invertasen ist unter Hypoxie wegen des herrschenden ATP-Mangels unwahrscheinlich, wodurch die stärkere Saccharose-Akkumulation in den transgenen Pflanzen zustande kommen könnte.

4.3.2 Die Phosphofructokinase scheint auf den PPi-Mangel nicht zu reagieren

Während die Expression der *E. coli* PPase die Saccharose-Spaltung in den Wurzeln besonders unter Hypoxie zu hemmen scheint, waren die Aktivitäten der Phosphofructokinasen nicht signifikant verändert, und zwar sowohl unter belüfteten Bedingungen als auch unter Hypoxie (Tab. 14). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den schon erwähnten Studien an Kartoffel-Knollen. Hier wurde eine Induktion der Aktivitäten der PFK und PFP in transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Geigenberger et al. 1998). Es wird angenommen, dass die Induktion dieser Enzyme den PPi-Mangel kompensieren könnte. Außerdem wurde gezeigt, dass Knollen sowohl von UPPaI- als auch von UPPaII-Pflanzen Fru2,6BP, einen Aktivator der PFP, akkumulieren (Jelitto et al. 1992, Hajirezaei und Sonnewald 1999). In den hier gezeigten Experimenten konnte nur eine 40%ige Akkumulation von Fru2,6BP gefunden werden (Tab. 12). Verursacht wird die Akkumulation wahrscheinlich dadurch, dass 3PGA, ein Inhibitor der Kinase-Aktivität der PF2K, im Gehalt verringert ist (Schema siehe Abb. 6, Stitt 1990). Dieser Mechanismus könnte eine weitere Reaktion der Pflanzen sein, den Mangel an PPi zu kompensieren.

Die belüfteten Wurzeln transgener Pflanzen zeigten außerdem ein höheres Fru1,6BP/ 3PGA-Verhältnis als der Wildtyp (Tab. 12). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die PFP bei verringerten PPi-Gehalten eher in gluconeogenetischer Richtung aktiv sein könnte (Schema siehe Abb. 5). Demzufolge könnte durch einen PFK/ PFP-Zyklus ATP in PPi umgewandelt werden (Geigenberger et al. 1998). Die PFK würde dabei Fru1,6BP bilden, das durch die PFP wieder abgebaut würde. Ein Hinweis darauf, dass solch eine Reaktion in den transgenen

Pflanzen ablaufen könnte, ist der Befund, dass die Wurzeln der Linie UPPa II-2 deutlich weniger ATP enthalten als die Wurzeln der Wildtyp-Pflanzen, obwohl die Netto-Glycolyse-Rate unverändert ist (Tab. 12, Abb. 29A). Eine Funktion dieses Zyklus könnte darin liegen, PPi für die energiesparende SuSy/ UGPase-Reaktion zu erhalten, und nicht nur auf die Invertasen angewiesen zu sein. Ein PFK/ PFP-Zyklus wurde auch für Mais-Pflanzen vorgeschlagen (Costa dos Santos et al. 2003). Die Autoren befürworten eine gluconeogenetische Richtung der PFP, wodurch PPi für die Reaktion der tPPase produziert werden könnte.

Unter Hypoxie-Bedingungen ist solch ein PFK/ PFP-Zyklus zur Kompensation des PPi-Mangels aufgrund des ATP-Mangels unwahrscheinlich. Demzufolge sinkt das Fru1,6BP/ 3PGA- Verhältnis in den transgenen Pflanzen nach Hypoxie, und erreicht nahezu das Wildtyp-Niveau (Tab. 12).

Die Aktivitäten der PFP und PFK waren unter Hypoxie-Bedingungen nahezu unverändert (Tab. 14). Dies weist darauf hin, dass die PPi-abhängige Phosphorylierung des Fru6P gegenüber der ATP-abhängigen Variante nicht bevorzugt wird. Dafür spricht auch der Befund, dass Fru2,6BP, der Aktivator der PFP, unter Hypoxie nicht akkumuliert wird (Tab. 12). Diese Daten werden auch unterstützt von früheren Experimente an Kartoffel-Wurzeln (Biemelt et al. 1999). Außerdem wird die PFP in Microarray-Studien mit *Arabidopsis* im Gegensatz zur SuSy unter Sauerstoffmangel nicht induziert (Liu et al. 2005, Loreti et al. 2005).

4.3.3 Glycolyse und Wachstum von PPi-defizienten Pflanzen sind nach Hypoxie deutlich gehemmt

Die Untersuchung der Kartoffel-Pflanzen mit geringerem PPi-Gehalt ergab Anzeichen dafür, dass die Saccharose-Spaltung im Vergleich zum Wildtyp gehemmt ist, wodurch die Konzentration der glycolytischen Intermediate abnahm (Tab. 12). Unter belüfteten Bedingungen war die Glycolyse-Rate jedoch mit der des Wildtyps vergleichbar (Abb. 29A), obwohl ATP-Gehalt (Tab. 12) und Wachstum (Tab. 15) negativ beeinflusst waren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Fluss durch die Glycolyse von den transgenen Pflanzen kompensiert werden konnte.

Behandlung der Pflanzen mit Hypoxie führte bei beiden Pflanzen-Typen dazu, dass die anaerobe Glycolyse-Rate, d.h. die Ethanol-Produktion, im Vergleich zur belüfteten Kontrolle anstieg (Abb. 29B). Dies wurde zum einen durch die Induktion der Gärungsenzyme ADH und PDC (Tab. 14), zum anderen durch einen höheren Gehalt an für die Gärung verwendbaren Kohlenhydraten (Tab. 12) verursacht. Induktion der Gärungsenzyme während einer Periode von Sauerstoffmangel ist eine allgemein bekannte Reaktion von Pflanzen (z.B. Drew 1997, Gibbs und Greenway 2003). Das Enzym für die Lactat-Gärung dagegen wurde bei Hypoxie in Kartoffeln in der Aktivität nur verdoppelt (Tab. 14). Es wurde schon früher gezeigt, dass die Lactat-Gärung in Pflanzen nur in den ersten Stunden einer Sauerstoffmangel-Phase eine Rolle spielt, während die Ethanol-Gärung während längerer Stress-Perioden stattfindet (Münch et al. 1993, Greenway und Gibbs 2003).

Im Gegensatz zu belüfteten Wurzeln waren die Wurzeln transgener Pflanzen nach einer Hypoxie-Periode nicht mehr in der Lage, die Glycolyse-Rate auf dem Wildtyp-Niveau zu halten (Abb. 29). Sowohl die aerobe CO₂-Produktion gestresster Wurzeln als auch die anaerobe Ethanol-Produktion waren in den transgenen Pflanzen deutlich geringer als im Wildtyp. Die Glycolyse-Aktivität war demnach durch PPi-Mangel im Zusammenhang mit dem Sauerstoffmangel eingeschränkt. Dies äußerte sich auch in einer deutlichen Hemmung des Wachstums. Hypoxie allein rief durch Abfall der ATP-Gehalte (Tab. 12) ein geringeres Wachstum in Kartoffelpflanzen hervor (Tab. 15), wie es schon früher beschrieben wurde (Biemelt et al. 1999). Bei den Pflanzen, die neben Hypoxie außerdem mit PPi-Mangel gestresst waren, zeigte sich eine starke Behinderung bei der Wiederaufnahme des Wachstums nach 4 Tagen Stress-Behandlung (Tab. 15). Daraus kann geschlossen werden, dass die Verlangsamung der Glycolyse infolge von PPi- und ATP-Mangel von den transgenen Pflanzen nicht mehr kompensiert werden kann.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass PPi eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Stoffwechsel und Wachstum unter Sauerstoffmangel und bei der Aktivierung des Stoffwechsels in der Wiederbelüftungsphase spielt. Dabei scheint vor allem die Saccharose-Spaltung PPi-abhängig zu sein. Eine Antisense-Hemmung der SuSy führte ebenfalls zu einem verzögerten Wachstum nach Hypoxie, obwohl bei diesen Pflanzen der Glycolyse-Stoffwechsel nicht beeinflusst war (Biemelt et al. 1999). Die PFP scheint nach diesen Ergebnissen in Pflanzen keine wichtige Bedeutung unter Sauerstoffmangel zu haben. Auch eine frühere Antisense-Hemmung der PFP in Kartoffel-Pflanzen ergab kaum Veränderungen

im Stoffwechsel und Wachstum der Pflanzen unter belüfteten Bedingungen (Hajirezaei et al. 1994). Im folgenden Abschnitt wurde deswegen mit neuen transgenen RNAi-Kartoffel-Pflanzen die Rolle der PFP unter Hypoxie untersucht.

4.4 Welche Funktion hat die PFP?

4.4.1 Kartoffelpflanzen mit verminderter PFP-Aktivität zeigen nur wenige Veränderungen unter aeroben Bedingungen

Die von der AG Peter Geigenberger bereitgestellten PFP-RNAi-Pflanzen, die ich für meine Versuche nutzen konnte, zeigten eine bis zu 100%ige Hemmung der PFP-Aktivität in den Blättern, sowie eine bis zu 95%ige Hemmung in den Wurzeln. Dabei war die PFP der Linie PFP#16 am stärksten inhibiert (Tab. 16). Die PFP-Aktivität in diesen neu hergestellten Pflanzen war demnach stärker gehemmt als in früher beschriebenen antisense-Pflanzen (Hajirezaei et al. 1994). Diese waren daher für die geplanten Versuche gut geeignet. Dennoch war die Hemmung der PFP-Aktivität nicht vollständig, da besonders die Wurzeln noch nennenswerte PFP-Aktivitäten aufwiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in Kartoffelpflanzen verschiedene Isoformen des Enzyms existieren könnten, die mit dem RNAi-Ansatz nicht vollständig abgebaut werden konnten. Dazu existierten zwar bisher keine veröffentlichten Daten, aber in dieser Arbeit sind sowohl im *Arabidopsis*-Genom (Abb. 37, Tab. 21) als auch im Reis-Genom (siehe Anhang, Abb. 1) mehrere Isoenzyme der PFP gefunden worden, so dass auch in Kartoffeln verschiedene PFP-Formen vermutet werden können.

Nach Meinung vieler Autoren ist die β -Untereinheit der PFP die katalytische Einheit, während die α -Untereinheit als Regulator fungieren soll (Yan und Tao 1984, Botha und Botha 1991, Theodorou et al. 1992, Theodorou und Plaxton 1996). In den Kartoffel-Pflanzen wurde nur ein RNAi-Konstrukt für die β -Untereinheit eingeführt, was die gesamte PFP-Aktivität hemmte. In den früher beschriebenen PFP-antisense-Pflanzen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass jeweils das Ausschalten einer Untereinheit zur Verminderung der PFP-Aktivität führte (Hajirezaei et al. 1994). Es kann daraus geschlossen werden, dass beide Untereinheiten für die Reaktion nötig sind, und sich nicht gegenseitig kompensieren können.

Die PFP-RNAi-Pflanzen zeigten weder im Gewächshaus noch in Gewebekultur oder Hydrokultur einen veränderten Phänotyp (Abb. 30). Frühere Untersuchungen mit Kartoffel- oder Tabak-Pflanzen, die verminderte PFP-Aktivitäten enthielten, wiesen ebenfalls darauf hin, dass das Wachstum durch Hemmung der PFP nicht beeinflusst wurde (Hajirezaei et al. 1994, Paul et al. 1995, Nielsen und Stitt 2001). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die PFP unter normalen Wachstumsbedingungen keine lebenswichtige Funktion in Kartoffel-Pflanzen hat.

Eine genauere Analyse des Primärstoffwechsels ergab einige kleine Veränderungen durch die PFP-Hemmung. So akkumulierten einige transgene Linien Glc6P und Saccharose im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 18, Tab. 19). Die ATP-Mengen dagegen veränderte sich nicht, ebenso wenig wie die Aktivität der PFK (Tab. 16, Tab. 19). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die bekannten transgenen Pflanzen beschrieben. So zeigten Kartoffel-Knollen (Hajirezaei et al. 1994) und Tabakblätter (Paul et al. 1995) etwas mehr Saccharose und HexoseP. In diesen früheren Untersuchungen wurde bei verringerter PFP-Aktivität außerdem ein verminderter TrioseP-Gehalt sowie 3- bis 5mal mehr Fru2,6BP gefunden (Hajirezaei et al. 1994, Paul et al. 1995, Nielsen und Stitt 2001). Die Daten können dahingehend interpretiert werden, dass die PFP unter normalen Bedingungen eine Tendenz zur glycolytischen Reaktionsrichtung zeigt, da Glc6P akkumuliert, und TrioseP absinkt. Auch der Anstieg an Fru2,6BP zeigt, dass von der Pflanze versucht wird, die geringere Menge an Enzym mit einer höheren Menge des Aktivators auszugleichen. Wie schon mehrfach erwähnt, ist Fru2,6BP ein starker Förderer der glycolytischen Reaktionsrichtung des Enzyms (Abb. 5, Huber 1986, Stitt 1990, Plaxton 1996).

Die verminderte PFP-Aktivität resultierte allerdings nicht in einem verminderten ATP-Gehalt in Kartoffel-Blättern (Tab. 19), Knollen (Hajirezaei et al. 1994) oder Tabak-Blättern (Paul et al. 1995). Dies, und das unveränderte Wachstum der transgene Pflanzen weisen darauf hin, dass die Glycolyse-Rate und der Energiehaushalt durch Hemmung der PFP nicht negativ beeinflusst wird, sondern von der Pflanze kompensiert werden kann. Auch der PPi-Gehalt war in Knollen oder Blättern transgener Pflanzen unverändert (Hajirezaei et al. 1994, Paul et al. 1995), was ebenfalls auf Kompensationsmöglichkeiten hinweist. Eine wichtige Frage bleibt aber weiterhin bestehen: kann die Pflanze die Hemmung der PFP kompensieren, weil sie im Überfluss vorhanden ist und gut reguliert werden kann, oder hat die PFP unter normalen Bedingungen keine Funktion (Hajirezaei et al. 1994)? Letztere Annahme ist unwahrscheinlich, da die PFP in allen bisher untersuchten Pflanzen vorhanden ist und stark exprimiert wird. Es ist eher wahrscheinlich, dass die wahre Funktion der PFP noch unentdeckt ist, oder die Hemmung der PFP zu gering ist, um Effekte zu finden. Stressbedingungen wie Kälte (Hajirezaei et al. 1994) oder Phosphat- bzw. Nitrat-Mangel (Paul et al. 1995) beeinflussten jedenfalls die transgenen Pflanzen auch nicht stärker als den Wildtyp. Es wäre interessant, in der Zukunft die vorhandenen PFP-RNAi-Pflanzen zusätzlich gentechnisch so zu modifizieren, dass der Fru2,6BP-Gehalt ebenfalls absinkt, um auch den Aktivator zu hemmen, und damit weitere Versuche durchzuführen.

4.4.2 Verändern sich die Reaktionen auf Hypoxie durch Ausschalten der PFP?

Auch unter Hypoxie-Bedingungen ist die Aktivität der PFP in den untersuchten Geweben der transgenen PFP-RNAi-Pflanzen bis zu 100% verringert (Tab. 16). Außerdem konnte, wie schon zuvor gezeigt (Tab. 14), im Wildtyp keine Induktion der PFP durch Hypoxie beobachtet werden. Behandlung der transgenen Pflanzen mit 3 Tagen Hypoxie verursachte im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Verminderung des Wachstums (Abb. 31). Auch der ATP-Gehalt war in den Pflanzen dieser Versuchsserie nach Hypoxie nicht vermindert, sondern sogar in einigen Linien in Blättern erhöht (Tab. 19). Wahrscheinlich werden 3 Tage Hypoxie, im Gegensatz zu 4 Tagen Stressbehandlung (Tab. 12), von Kartoffeln noch relativ gut toleriert.

Diese Befunde führen zu der Annahme, dass die PFP auch unter Sauerstoffmangel in Kartoffeln keine lebenswichtige Funktion hat. Dies wird durch die Beobachtung der anoxischen Gärungsraten nach Hypoxie bestätigt (Abb. 32). Auch diese waren im Vergleich zwischen Wildtyp und transgenen Pflanzen nicht signifikant verändert, wenn auch die bereits beschriebene Beobachtung eintrat, dass hypoxisch vorbehandelte Wurzeln aller untersuchten Linien deutlich mehr Ethanol produzieren konnten als belüftete Wurzeln, bedingt durch erhöhte Zuckergehalte (Tab. 18) und höhere Aktivitäten der Gärungsenzyme (Tab. 16). Auch unveröffentlichte Versuche zur anaeroben Atmungsrate von Kartoffelscheiben transgener Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp (Hajirezaei 1993, Nielsen und Stitt 2001).

Experimente mit transgenen Tabakpflanzen mit erhöhter PFP-Aktivität ergaben ebenfalls, dass die PFP kein limitierendes Enzym in Pflanzen ist (Wood et al. 2002). Diese Pflanzen zeigten sogar verringerte Biomassen und Stärke-Gehalte in den Blättern.

Dennoch gab es einige interessante Unterschiede im Verhalten der am stärksten gehemmten transgenen Linie PFP#16. Zum einen akkumulierte sie unter Hypoxie in den Wurzeln mehr lösliche Zucker, aber nicht mehr Glc6P als der Wildtyp (Tab. 18, Tab. 19), was darauf hinweist, dass eventuell der Zuckerabbau gestört ist, aber nicht der glycolytische Abbau von Glc6P. Auch die Gärungsrate von PFP#16 war so hoch wie im Wildtyp (Abb. 32), was ebenfalls eine Hemmung der Glycolyse unwahrscheinlich macht. Die Wurzeln zeigten unter Hypoxie eine 20% höhere PFK-Aktivität, um eventuell einen Verlust der PFP auszugleichen (Tab. 16). Aus den vorhandenen Daten kann nur geschlussfolgert werden, dass die anaerobe

Glycolyse-Rate und der Energiestoffwechsel durch die PFP-Hemmung nicht behindert werden. Detailliertere Untersuchungen der anderen glycolytischen Intermediate müssen folgen, um hier eine differenziertere Aussage treffen zu können.

Die Hypothese, dass die PFP in Kartoffeln unter Sauerstoffmangel keine wesentliche Rolle spielt, wird zudem unterstützt von den im Abschnitt 4.3.2 diskutierten Daten der UPPa II-2-Pflanzen, bei denen die PFP-Reaktion ebenfalls nicht durch Mangel an PPi in Kombination mit Hypoxie beeinflusst war. Auch die schon erwähnten Untersuchungen an *Arabidopsis* zeigten keine Induktion der PFP-Expression bei Sauerstoffmangel (Tab. 24, Liu et al. 2005, Loreti et al. 2005, Dongen, pers. Mitteilung). Diesen Beobachtungen an zweikeimblättrigen Pflanzen stehen Experimente mit Gräsern gegenüber, die eine Induktion der PFP unter Sauerstoffmangel beschreiben. Vor allem in Reis-Koleptilen wurde eine Induktion der PFP unter Anoxie gefunden (Tab. 24, Mertens et al. 1990, Mohanty et al. 1993, Gibbs et al. 2000, Kato-Noguchi 2002). Es könnte nun postuliert werden, dass es eine Strategie der überflutungstoleranten Reis-Pflanzen sei, unter Sauerstoffmangel bevorzugt die PFP zu nutzen. Experimente mit transgenen Reis-Pflanzen, die verminderte PFP-Aktivitäten aufweisen, könnten in Zukunft diesen Punkt aufklären.

Tab. 24: Induktion der Expression verschiedener Enzyme des Primärstoffwechsels unter Sauerstoffmangel im Vergleich zur belüfteten Kontrolle, ausgewählt aus verschiedenen Microarray-Experimenten.

Pflanzenart	Organ	Stressart	Dauer	PFP a	PFP b	PFK	SuSy	PDC	ADH	Quelle
<i>Arabidopsis</i>	Keimling	4% O ₂ , dunkel	2 h	100%	100%	3 x	?	5-30 x	?	Dongen, pers. Mitteilung
<i>Arabidopsis</i>	Keimling	3% O ₂ , Schwachlicht	6 h	60%	50%	1.3 x	2-9 x	3-18 x	13 x	Liu et al. 2005
<i>Arabidopsis</i>	Keimling	0% O ₂ , dunkel	6 h	100%	100%	5-6 x	20-70 x	12-170 x	45 x	Loreti et al. 2005
Reis	Keimling	Überflutung	8 h	3 x	7-18x	3-30 x	2 x	7-50 x	15-30 x	Tsutsumi (Yazaki et al. 2002)
Gerste	Wurzel	Hypoxie	4 h	1.5-13 x	180%	?	3-6 x	?	30 x	Albrecht, pers. Mitteilung
Gerste	Wurzel	Anoxie	4 h	1.5-23 x	180%	?	3-5 x	?	45 x	Albrecht, pers. Mitteilung

4.4.3 Auswirkungen eines verminderten Fru2,6BP-Gehaltes auf Kartoffel-Pflanzen unter aeroben Bedingungen

Die früher beschriebenen transgenen Pflanzen mit verringerter PFP-Aktivität sowie die in dieser Arbeit gezeigten Pflanzen (Abb. 30) zeigten keinen Phänotyp im Wachstum, was eventuell darauf zurückzuführen sein könnte, dass in diesen Pflanzen Fru2,6BP akkumulierte, welches die fehlende PFP-Enzymmenge kompensierte (Hajirezaei et al. 1994, Paul et al. 1995, Nielsen und Stitt 2001). Mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes sollten daher Kartoffel-Pflanzen erzeugt werden, die weniger Fru2,6BP enthielten, was vielleicht ebenfalls eine verringerte PFP-Aktivität hervorrufen könnte. Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen mit geringerem Fru2,6BP-Gehalt waren schon früher bekannt (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001). Während die in dieser Arbeit vorgestellten Fru2,6BP-RNAi-Kartoffel-Pflanzen hergestellt wurden, wurden von einer anderen Arbeitsgruppe Ergebnisse mit PF2K-antisense-Kartoffel-Pflanzen veröffentlicht (Rung et al. 2004).

Für die geplanten Experimente wurden 5 Linien mit geringerer mRNA-Menge der PF2K ausgewählt (Abb. 34). Diese zeigten keinen deutlichen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 35). Die Kohlenhydrat-Gehalte waren allerdings leicht verändert. Während in den Blättern teilweise weniger Stärke vorhanden war, akkumulierten die Wurzeln einiger Linien mehr lösliche Zucker (Tab. 20). Diese Daten stimmen überein mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die mehr Saccharose, aber weniger Stärke in Blättern transgener Pflanzen mit geringerem Fru2,6BP-Gehalt zeigten (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001, Rung et al. 2004). Zusätzlich wurden dort eine Akkumulation von HexoseP sowie verringerte TrioseP-Gehalte beschrieben. Neben Pflanzen mit geringerem Fru2,6BP-Gehalt sind auch Pflanzen mit erhöhtem Fru2,6BP-Gehalt hergestellt worden (Scott et al. 1995, Truesdale et al. 1999, Kato-Nohuchi et al. 2001). Hier konnte eine Verschiebung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in Richtung Stärke-Synthese beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fru2,6BP für die Regulation der Stärkesynthese in Blättern wichtig ist (Abb. 6). Das Wachstum aller bisher untersuchten transgenen Pflanzen war allerdings nicht deutlich beeinflusst.

Eine weitere Analyse der ausgewählten transgenen Pflanzen ist in Zukunft erforderlich. Insbesondere muss noch die Messung der Fru2,6BP-Gehalte erfolgen, um eine erfolgreiche Verminderung der Fru2,6BP-Synthese bestätigen zu können. Weitere Untersuchungen, insbesondere des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in den Wurzeln, sollen sich ebenfalls

anschließen, um eine mögliche Bedeutung von Fru2,6BP in heterotrophen Geweben zu finden.

4.4.4 Gärungsverhalten von Wurzeln der F2,6BP-RNAi-Pflanzen

Sollte nach der Ausgangshypothese die PFP eine wichtige Rolle bei der Glycolyse unter Sauerstoffmangel spielen, würde ein verminderter Fru2,6BP-Gehalt in einer geringeren Gärungsrate der Kartoffel-Wurzeln resultieren. Die hier gezeigten Ergebnisse wiesen allerdings darauf hin, dass eine deutlich verringerte Menge an PF2K-Transkript in den F2,6BP-Pflanzen (Abb. 34) nicht in einer verringerten Gärungsrate hypoxisch vorbehandelter Wurzeln unter Anoxie mündete (Abb. 36). Zwei Linien zeigten sogar erhöhte Gärungsraten im Vergleich zum Wildtyp (F2,6BP#16, #26). Dies könnte eventuell dadurch verursacht worden sein, dass Pflanzen mit geringerem Fru2,6BP-Gehalt generell mehr lösliche Zucker enthalten (Tab. 20). Allerdings muss eine Analyse des Primärstoffwechsels unter Hypoxie diese Hypothese noch bestätigen. Ob die beiden Linien mit erhöhter Gärungsrate mit besonders geringen Fru2,6BP-Gehalten korrelieren, oder dieser Befund durch andere Prozesse verursacht wurde, muss ebenfalls in Zukunft untersucht werden.

Trotz der fehlenden Daten kann davon ausgegangen werden, dass Fru2,6BP keine wesentliche Bedeutung für die Glycolyse von sensiblen Kartoffel-Pflanzen unter Hypoxie hat. Dies ist auch aus verschiedenen anderen Beobachtungen abzuleiten. So akkumulierten Kartoffel-Wurzeln unter Hypoxie kein Fru2,6BP (Tab. 12), im Gegensatz zu Reis-Pflanzen (Mertens et al. 1990, Kato-Noguchi 2002). Außerdem wird in ebenfalls sensiblen *Arabidopsis*-Pflanzen die PF2K bei Sauerstoffmangel nicht induziert, wie Microarray-Studien zeigen (Loreti et al. 2005).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich die beiden verwendeten Kartoffel-Varietäten im Toleranzgrad gegenüber Hypoxie wesentlich unterscheiden. Während Wurzeln intakter Pflanzen der Varietät Desiree Hypoxie mehr als 4 Tage lebend überstanden, wenn auch drastische Wachstumseinschränkungen zu beobachten waren (Tab. 15), überlebten Wurzeln der Varietät Solara nur 2 Tage. Solara-Pflanzen, die sich zwar leichter transformieren lassen als Desiree (Biemelt, pers. Mitteilung), ließen sich jedoch außerdem schlechter in Hydrokultur überführen. Solara scheint also sehr ungünstig für Sauerstoffmangel-Experimente zu sein. Dagegen wurde für die Varietät Desiree beschrieben, dass sie unter

diesen Stressbedingungen besonders tolerant ist (Arpagaus und Brändle 2000). Für die Planung zukünftiger Experimente sollten solche Unterschiede berücksichtigt werden.

4.4.5 Welches ist die bevorzugte Reaktionsrichtung der PFP?

Zusammenfassend sollen hier nochmals die verschiedenen Experimente zur PFP betrachtet werden. Die Versuche mit den PFP-RNAi-Pflanzen ergaben, dass Wachstum und Entwicklung durch eine verminderte PFP-Menge nicht behindert waren (Abb. 30, Abb. 31). Die Akkumulation von Saccharose und Glc6P in transgenen Pflanzen unter nicht gestressten Bedingungen (Tab. 18, Tab. 19) lässt aber darauf schließen, dass die PFP hier eine Tendenz zur glycolytischen Richtung zeigt, wie schon von Hajirezaei et al. (1994) vorgeschlagen. Auch verschiedene Versuche mit Kartoffeln, die weniger Fru2,6BP enthielten, und deswegen lösliche Zucker und HexoseP akkumulierten (Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001, Rung et al. 2004), sprechen für diese Annahme. Bei PPi-Mangel, wie er in den UPPa II-2-Pflanzen auftritt, scheint die PFP in Richtung Gluconeogenese zu funktionieren, um den Mangel zu kompensieren. Dies ist aus einem erhöhten Fru6P/ 3PGA-Verhältnis und einem verringerten ATP-Gehalt (Tab. 12) abzuleiten (Abschnitt 4.3.2).

Unter Hypoxie scheint allerdings weder die eine noch die andere Richtung bevorzugt zu werden, und die PFP könnte in Kartoffelpflanzen bedeutungslos sein. Folgende Ergebnisse sprechen für diese Hypothese:

- i. Es herrscht ATP-Mangel, der einen möglichen, PPi-liefernden PFK/ PFP-Zyklus unwahrscheinlich macht (Tab. 12).
- ii. Weder wird die PFP bei Hypoxie induziert (Tab. 14, Tab. 16), noch steigt der Gehalt von Fru2,6BP im Gewebe (Tab. 12).
- iii. Pflanzen mit stark verminderter PFP-Aktivität zeigen keine verringerten Gärungsraten (Abb. 32), ebenso Pflanzen mit verringertem Fru2,6BP-Gehalt (Abb. 36).

Die postulierten Reaktionsrichtungen sind in Abb. 41 zusammengefasst. Es lässt sich schlussfolgern, dass die PFP wahrscheinlich ein regulatorisch eingreifendes Enzym ist, welches je nach Bedarf reagiert und seine Reaktionsrichtung ändern kann. Dies erklärt auch die unterschiedlichen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen zur bevorzugten Reaktionsrichtung des Enzyms (Abschnitt 1.9.2).

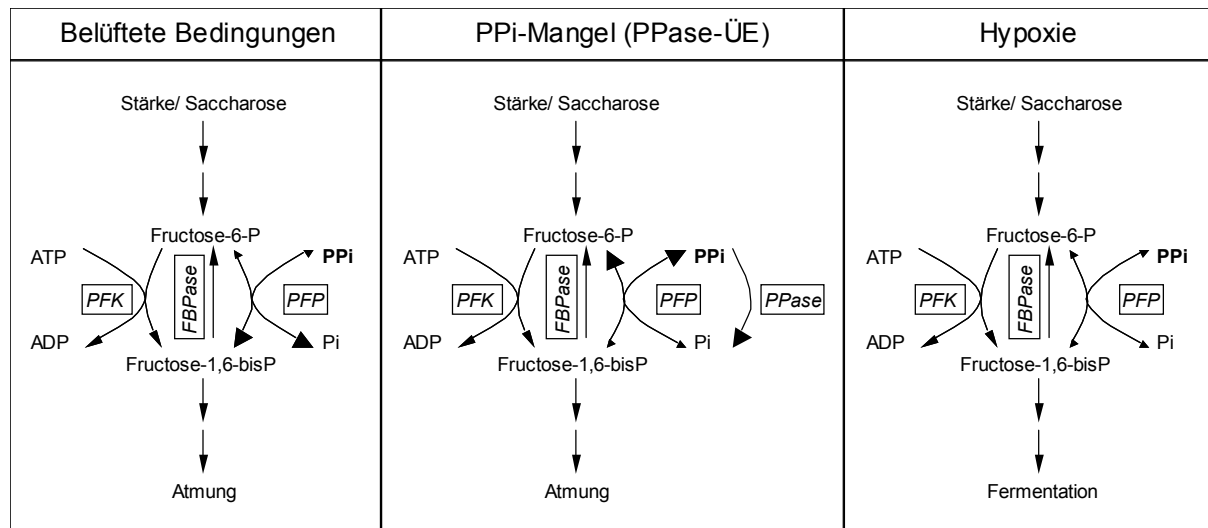


Abb. 41: Schema der möglichen bevorzugten Reaktionsrichtung der PFP in Kartoffel-Pflanzen. Die Größe der Pfeilspitzen gibt die bevorzugte Richtung an. A: Unter belüfteten Bedingungen scheint die PFP eher die Reaktion in Richtung Glycolyse zu katalysieren. B: Bei Überexpression der PPase kompensiert die PFP eventuell einen PPi-Mangel und läuft in gluconeogenetischer Richtung. C: Unter Hypoxie-Bedingungen ist keine bevorzugte Reaktionsrichtung festzustellen. PFK, ATP-abhängige Phosphofructokinase; PFP, PPi-abhängige Phosphofructokinase; FBPase, Fructose-1,6-bisphosphatase; PPase-ÜE, Pyrophosphatase-Überexpression.

4.5 Klonierung der PFK aus *Arabidopsis*

4.5.1 *Arabidopsis thaliana* enthält 7 PFK-Gene

Bisher waren noch von keiner Pflanze Sequenzen der ATP-abhängigen Phosphofructokinase (PFK) beschrieben worden, obwohl es eines der wichtigsten Enzyme im glycolytischen Stoffwechsel ist (Plaxton 1996). Mit einem theoretischen Ansatz sollte versucht werden, sich diesem Problem zu nähern. Aus dem Genom von *Arabidopsis* wurden 12 Sequenzen ausgewählt und in einem Sequenzvergleich mit bekannten Phosphofructokinase-Genen verglichen (Abb. 37). Das Gen At1g07110 fiel zusammen mit anderen PF2Ks (Kartoffel, Draborg et al. 1999; Spinat, Larondelle et al. 1986), womit eine frühere Einordnung bestätigt wurde (Villadsen et al. 2000). Die beiden Untereinheiten-Gruppen der PFP enthielten jeweils zwei *Arabidopsis*-Sequenzen (PFP- α , At1g20950, At1g76550; PFP- β , At1g12000, At4g04040). Diese Gruppen werden von verschiedenen Autoren in die Phosphofructokinase-Gruppe II, Abteilung „long“ eingeordnet (Mertens et al. 1998, Müller et al. 2001, Baptiste et al. 2003), die auch einige PFPs von Einzellern enthalten.

Die letzte Gruppe der *Arabidopsis*-Phosphofructokinase-Gene, in die 7 Sequenzen einzuordnen waren (At2g22480, At4g26270, At4g29220, At4g32840, At5g47810, At5g56630, At5g61580), war verwandt mit verschiedenen PFKs von Mikroorganismen, die zur Phosphofructokinase-Gruppe II, Abteilung „X“ gehörten (Mertens et al. 1998, Müller et al. 2001, Baptiste et al. 2003). Hierin aufgenommen sind z.B. auch PFKs von *Entamoeba histolytica* (Chi und Kemp 2000), *Trypanosoma brucei* (Michels et al. 1997) und *Amycolatopsis methanolica* (Alves et al. 2001). Im Moment sind diese Gene in der „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) als „phosphofructokinase family protein“ annotiert. Diese Gruppe war in meinem Sequenzvergleich mehr mit der Gruppe I der „echten“ PFKs aus Tieren und Menschen verwandt (Siebers et al. 1998) als mit den pflanzlichen PFPs (Abb. 37). Die 7 Sequenzen dieser Gruppe waren demnach gute Kandidaten für die gesuchten pflanzlichen ATP-abhängigen Phosphofructokinasen. Eine ähnliche Gruppierung der Phosphofructokinase-Gene aus *Arabidopsis* ergab sich, wenn die Exon-Strukturen miteinander verglichen wurden (Abb. 38), wobei sich allerdings 2 PFK-Gene deutlich von allen anderen unterschieden (PFK2, PFK5). Von anderen Autoren wurde ebenfalls die Einordnung der 11 *Arabidopsis*-Phosphofructokinase-Gene in drei Gruppen vorgeschlagen (Nielsen et al. 2004).

Tab. 25: Übersicht über die PPi-abhängigen Phosphofructokinasen, die bereits aus Pflanzen isoliert wurden. MW, Molekulargewicht [kDa]; UE, Untereinheit.

Pflanzenart	Organ	Enzym	α -UE	β -UE	Anzahl UE	Quelle
			MW [kDa]			
<i>Ananas comosus</i>	Blatt	97.2	61	62	2	Tripodi und Podesta 1997
<i>Brassica nigra</i>	Zellkultur	500	66	60	8	Theodorou und Plaxton 1996
<i>Citrullus lanatus</i>	Samen		68	65		Botha und Botha 1991
<i>Daucus carota</i>	Wurzel	294	65-67	60	4	Wong et al. 1988
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Frucht	425	62	61	6	Kobayashi et al. 1992
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Frucht	443	68	68	4	Wong et al. 1990
<i>Musa acuminata</i>	Frucht	490	66	60	8	Turner und Plaxton 2003
<i>Oryza sativa</i>	Keimling	103	-	-	1	Enomoto et al. 1992
<i>Phaseolus coccineus</i>	Stengel	450, 220				Kowalczyk 1987
<i>Ricinus communis</i>	Samen		67	60		Todd et al. 1995
<i>Solanum tuberosum</i>	Knolle	265	65	60	4	Kruger und Dennis 1987
<i>Solanum tuberosum</i>	Knolle	460	65	25	8	Podesta et al. 1994
<i>Solanum tuberosum</i>	Knolle		66	60	4	Teramoto et al. 2000
<i>Spinacia oleracea</i>	Blatt		65	60		Theodorou und Kruger 2001
<i>Triticum aestivum</i>	Samen	170	90	80	2	Mahajan und Singh 1989
<i>Triticum aestivum</i>	Blatt	234	67	60	2 oder 4	Yan und Tao 1984
<i>Arabidopsis thaliana</i>			67.1, 67.5	61.4, 64.5		diese Arbeit

Nach der Klonierung und Expression der putativen PFK-Gene stellte sich heraus, dass zumindest vier der sieben putativen PFK-Gene eindeutig erhöhte PFK-Aktivität, aber keine erhöhte PFP-Aktivität in transient transformierten Tabak-Blättern hervorriefen (Tab. 22). Somit scheint bewiesen, dass *Arabidopsis*, wie wahrscheinlich auch alle anderen Pflanzen, PFK-Gene enthält, die in einer Genfamilie mit den oben erwähnten 7 Mitgliedern zusammengefasst werden können. Diese unterscheiden sich aber in ihrer Sequenz deutlich von den PFK-Genen der tierischen Organismen. Sie zeigen eher höhere Homologie zu einigen PFKs von Mikroorganismen wie *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei* und *Amycolatopsis methanolica* (Abb. 37, Müller et al. 2001, Baptiste et al. 2003). Aus dieser

Verschiedenheit in der Sequenz könnten auch die biochemischen Unterschiede der pflanzlichen PFKs im Vergleich zu denen der Tiere erklärt werden. So wird bei den Tieren die PFK durch Fru2,6BP stark reguliert, in Pflanzen dagegen nicht (Plaxton 1996). Hier werden, wie schon erwähnt, die PFPs durch Fru2,6BP reguliert (Stitt 1990).

Tab. 26: Übersicht über die ATP-abhängigen Phosphofructokinasen, die bereits aus Pflanzen isoliert wurden. MW, Molekular-Gewicht, SP, Signalpeptid.

Pflanzenart	Organ		Cytosolische Form		Plastidäre Form		Quelle
			Enzym	Untereinheiten MW [kDa]	Enzym	Untereinheiten MW [kDa]	
<i>Cucumis sativus</i>	Samen	2 Formen	180	40, 42, 47	180	39, 41.5, 53	Cawood et al. 1988
<i>Daucus carota</i>	Wurzel		5000	60, 68			Wong et al. 1987
<i>Glycine max</i>	Knöllchen	2 Formen	200, 2000	33, 55, 59, 62			Vella und Copeland 1993
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Frucht		180	35			Isaac und Rhodes 1982
<i>Musa acuminata</i>	Frucht	3 Formen		33			Iyer et al. 1989b
<i>Musa acuminata</i>	Frucht	2 Formen	210	instabil	160	instabil	Turner und Plaxton 2003
<i>Ricinus communis</i>	Samen		vorhanden	instabil	175		Garland und Dennis 1980a
<i>Ricinus communis</i>	Samen		vorhanden	instabil	220	57	Knowles et al. 1990
<i>Ricinus communis</i>	Samen		vorhanden	61.5			Podesta et al. 1994
<i>Solanum tuberosum</i>	Knolle	4 Formen	200-800	46.3, 49.5, 50, 53			Kruger et al. 1988
<i>Spinacia oleracea</i>	Blatt				vorhanden		Kelly und Latzko 1977
<i>Spinacia oleracea</i>	Blatt		vorhanden	50-70			Hausler et al. 1989a
<i>Triticum aestivum</i>	Samen		182				Mahajan und Singh 1992
<i>Arabidopsis thaliana</i>		7 Isoenzyme		49, 51, 52, 53, 54		58.5, 58.6 (inkl. SP)	diese Arbeit

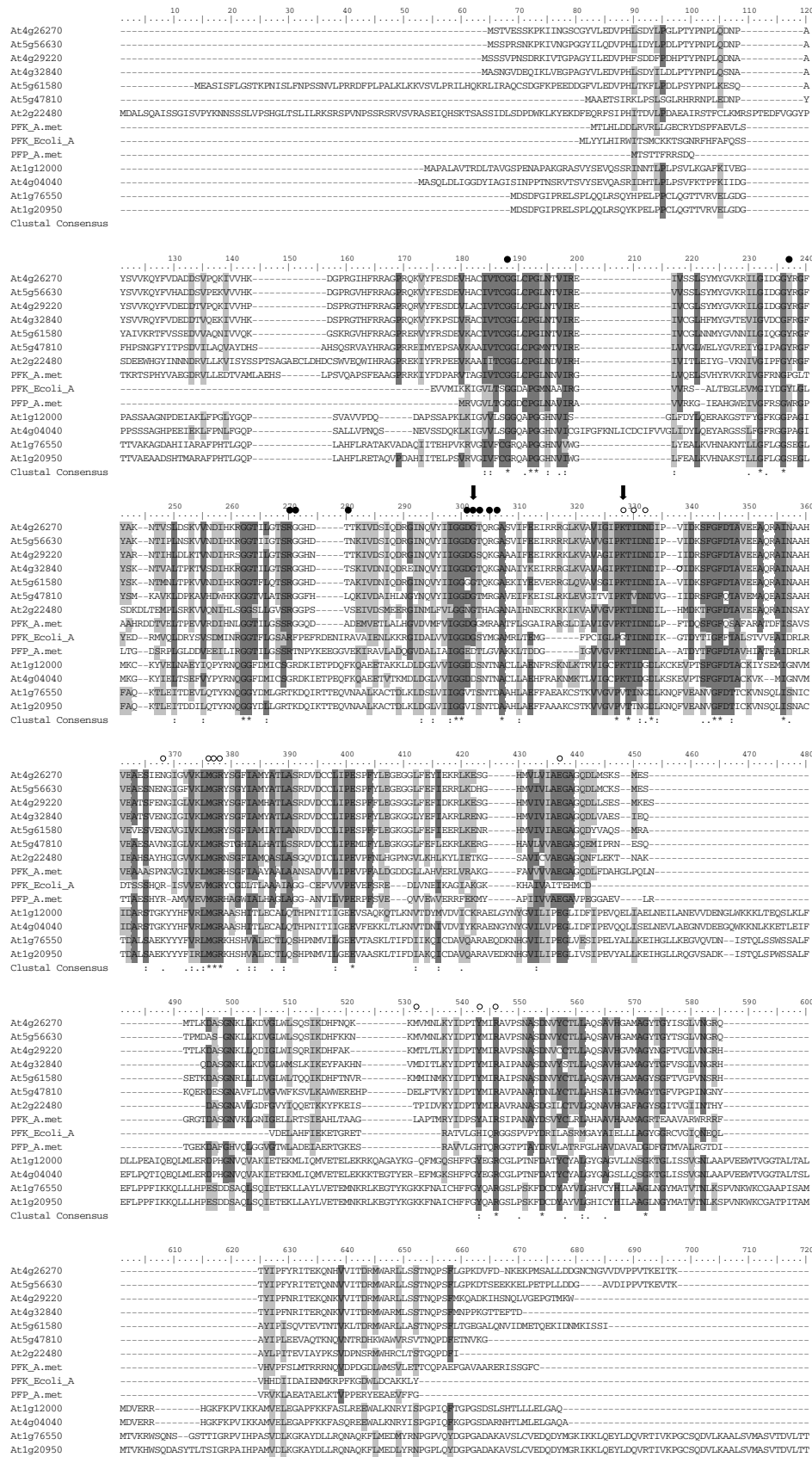


Abb. 42: Sequenzvergleich der Aminosäure-Sequenzen der Phosphofructokinasen. Markiert sind einander ähnliche Bereiche. Ausgefüllte Kreise zeigen putative ATP-Bindestellen, offenen Kreise putative Fru6P-Bindestellen (Shirakihara und Evans 1988). Pfeile weisen auf die beiden besonders wichtigen Bindestellen Gly104 und Gly124 in der Phosphofructokinase von *E. coli* hin (Chi und Kemp 2000, Moore et al. 2002, Bapteste et al. 2003). Ähnlichkeiten sind dunkel unterlegt.

Für die drei PFK-Sequenzen, die nur leicht erhöhte PFK-Aktivitäten zeigten, waren eventuell Fehler während der PCR-Reaktion aufgetreten. Nach kompletter Sequenzierung der klonierten Gene und dem Vergleich mit den Sequenzen in der Datenbank ergab sich, dass jeweils einzelne Basen fehlten (siehe Anhang A). Dies würde zum vorzeitigen Stop der Translation führen, und könnte die Ursache für das Ausbleiben einer hohen PFK-Aktivität gewesen sein (Tab. 22). Wiederholung der PCR-Reaktion mit einer fehlerlosen DNA-Polymerase sollte in Zukunft erfolgen.

Die pflanzliche PFP ist inzwischen relativ genau charakterisiert. Es bestätigte sich auch für *Arabidopsis*, dass zwei verschiedene Untereinheiten mit Molekulargewichten um 67 bzw. 62 kDA existieren, wie bereits für verschiedene Pflanzen beschrieben (zusammengefasst in Tab. 25). Diese bilden meist ein Heterotetramer. Für die PFKs dagegen kann solch eindeutige Aussage nicht getroffen werden. Die bisherigen Daten von Proteinisolationen (zusammengefasst in Tab. 26) weisen nicht auf eine bevorzugte Richtung der Komplexbildung hin. Dennoch neigten die PFK-Untereinheiten zur Bildung von Komplexen, die auch große Aggregate formen können (Wong et al. 1987), und häufig aus verschiedenen Untereinheiten bestehen (z.B. Cawood et al. 1988, Kruger et al. 1988, Vella und Copeland 1993). Wie die 7 in *Arabidopsis* gefundenen Isoenzyme miteinander interagieren, muss in Zukunft weiter untersucht werden. Auch für Reis sollte diese Analyse noch erfolgen. Bei einer ersten Durchsuchung des Reis-Genoms ergab sich, dass es hier mindestens 14 Phosphofructokinase-Gene gibt, wovon 9 Sequenzen zu den PFKs gehören, 4 Sequenzen zu der α -Form der PFP, und eine Sequenz zur β -Form der PFP (siehe Anhang, Abb. 1).

4.5.2 Bindestellen von ATP und Fru6P

Für die PFK aus *E. coli* wurde bereits eine kristalline Struktur beschrieben (Shirakihara und Evans 1988), in der die putativen ATP- und Fru6P-Bindestellen postuliert werden. Diese Positionen sind in Abb. 42 mit Kreisen markiert. Es wird dabei sichtbar, dass die für *E. coli* postulierten ATP-Bindestellen ähnlicher zu den 7 PFK-Genen aus *Arabidopsis* sind als zu den 4 PFP-Genen.

Später wurde vorgeschlagen, dass besonders zwei Positionen für die ATP-Bindung des PFK-Proteins aus *E. coli* wichtig sind (Chi und Kemp 2000, Moore et al. 2002, Baptiste et al. 2003). Hierbei handelt es sich um die Positionen Gly₁₀₄ (im GGDG-Motiv) und Gly₁₂₄ (im PGTIDXD-Motiv). Diese beiden Stellen sind in Abb. 42 mit Pfeilen markiert. Während die

ATP-bindenden Formen Gly an beiden Stellen enthalten, sind bei der PFP-bindenden Form gewöhnlich Asp und Lys vorhanden. Eine genauere Analyse dieser Bindestellen wurde an der Amöbe *Entamoeba histolytica* durchgeführt. Sie enthält beide Phosphofructokinase-Formen, die PFP und die PFK. Wenn die beiden Positionen Asp₁₇₅ und Lys₂₀₁ im PFP-Gen mutiert wurden, veränderte sich die bevorzugte Bindungsform von PPi zu ATP (Chi und Kemp 2000). Dabei war der Wechsel von Asp₁₇₅ zu Gly effektiver als der Wechsel von Lys₂₀₁ zu Gly.

Im Sequenzvergleich der Phosphofructokinase-Enzyme aus *Arabidopsis* war bei allen PFK-Enzymen an der *E. coli*-Stelle Gly₁₀₄ Gly vorhanden, während die PFP-Enzyme Asp enthielten (Abb. 42). An der anderen Position, der weniger wichtigen Gly₁₂₄-Position (Chi und Kemp 2000), enthielten alle PFK-Enzyme aus *Arabidopsis* Lys statt Gly. Dies zeigt, dass das Gly an dieser Position in der ATP-Bindung bei pflanzlichen Enzymen nicht wichtig ist. Auch bei verschiedenen PFKs von Einzellern, die ATP nutzen, ist Lys an der zweiten Position vorhanden (Baptiste et al. 2003). Diese Enzyme werden in der Phosphofructokinase-Gruppe II, Abteilung „X“, eingeordnet (Abb. 37).

4.5.3 Intracelluläre Lokalisation der PFKs

Für Pflanzen wurden sowohl cytoplasmatische als auch plastidäre Formen der PFK beschrieben (zusammengefasst in Tab. 26). Erstere Form ist wichtig für die Glycolyse im Cytosol, während letztere Form eine Rolle beim glycolytischen Stärkeabbau in Chloroplasten bei Dunkelheit sowie in Plastiden nichtgrüner Gewebe spielt (Plaxton 1996). Im Gegensatz dazu wurden für die PFP bisher nur cytosolische Formen beschrieben (zusammengefasst in Tab. 25). Auch für *Arabidopsis* treffen diese Beobachtungen zu (Tab. 21).

Mit Hilfe des Online-Programms TargetP Server v1.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, Emanuelson et al. 2000) wurde eine Verteilung der putativen PFK-Gene in der Zelle untersucht. Dabei ergab die Analyse für zwei der sieben Gene eine plastidäre Verteilung (At5g61580, At2g22480, Tab. 21). Während die reife mRNA der cytosolischen Gene um 1.400 bp groß war, waren die beiden plastidären Isoformen etwa 1.600 bp groß, was auf ein vorgeschaltetes Signalpeptid hinweist (Tab. 21). Erste Untersuchungen von PFK3 und PFK4 mit Hilfe von GFP-Konstrukten weisen auf eine cytosolische Lokalisation der PFK3 sowie eine plastidäre Lokalisation der PFK4 hin (Abb. 43, Biemelt, pers. Mitteilung).

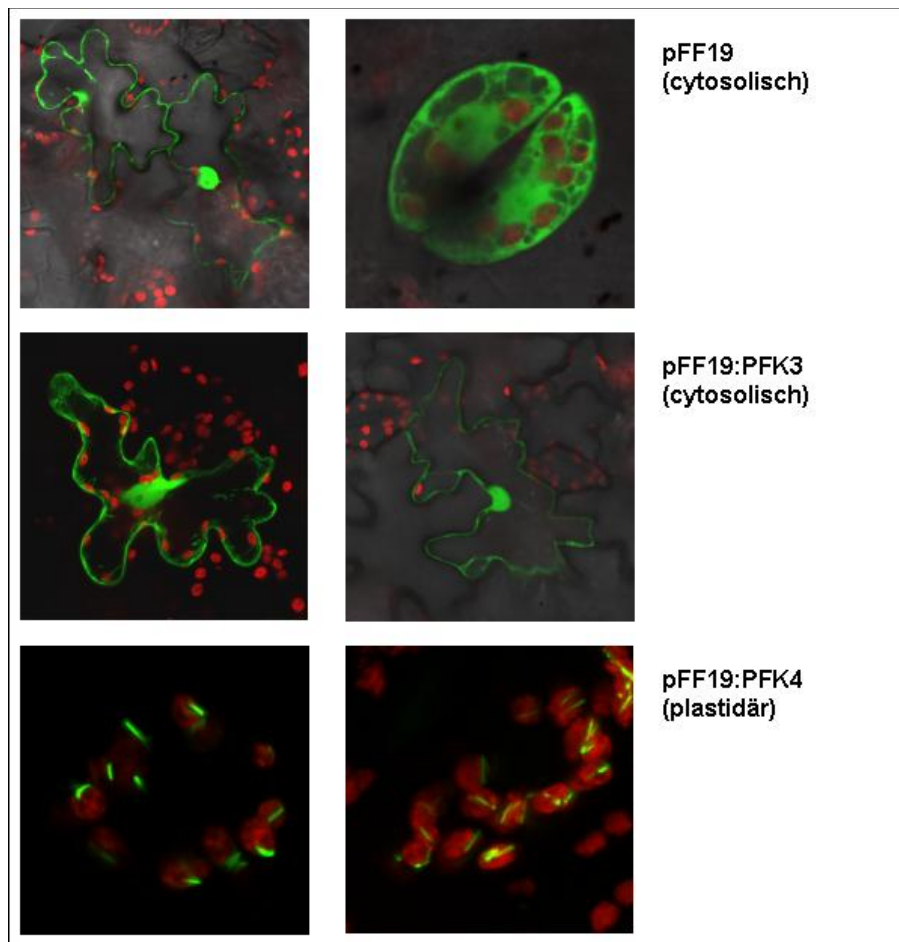


Abb. 43: Lokalisierung zweier PFK-Gene aus *Arabidopsis*. Ein Konstrukt aus der jeweiligen PFK-Sequenz und GFP wurde durch „Particle-Bombardment“ in Tabakblätter gebracht, und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Biemelt, pers. Mitteilung).

4.5.4 Gewebespezifische Expression und Expression unter Stress-Bedingungen

Die Tatsache, dass *Arabidopsis* 7 PFK-Gene enthält, führt zu der Vermutung, dass jedes Gen eine spezifische Funktion oder einen spezifischen Wirkungsort aufweist. Zusätzlich zu der hier durchgeführten Analyse der Expression der PFKs in einigen Geweben (Abb. 39) können durch das Betrachten gesammelter Daten aus dem Internet (www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de, Steinhauser et al. 2004; www.genevestigator.ethz.ch, Zimmermann et al. 2004) Vermutungen über die gewebespezifische Expression der PFK-Gene sowie der Expression bei unterschiedlichen Stress-Bedingungen angestellt werden (Tab. 27, Tab. 28).

Für Kontrollbedingungen lässt sich sagen, dass einige Formen der PFK in vielen pflanzlichen Geweben exprimiert werden (PFK1, 3, 4, 5, 7, Abb. 39). PFK2 und PFK6 finden sich dagegen kaum in den untersuchten Geweben. Dies bestätigt sich auch durch Daten von Microarray-Analysen (Tab. 27). Die PFK2 wird dagegen als Hauptform in reifen und keimenden Samen

exprimiert (Tab. 27). PFK3 und PFK4 sind verstärkt in seneszenten Blättern aktiv, während PFK7 hauptsächlich in Wurzeln zu finden ist. Auch die 4 Isoformen der PFP werden in allen Geweben mehr oder weniger stark exprimiert (Tab. 27).

Tab. 27: Gewebespezifische Expression der Phosphofructokinase-Gene in *Arabidopsis*-Pflanzen. Die Daten wurden aus verschiedenen veröffentlichten Microarray-Analysen zusammengefasst (www.csbdb.mpimgolm.mpg.de). Dargestellt sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte. Fett markiert sind jeweils die Gewebe mit besonders starker Expression eines Gens.

	PFK1	PFK2	PFK3	PFK4	PFK5	PFK6	PFK7	PFPA1	PFPA2	PFPB1	PFPB2
Wurzel	175	41	117	110	305	78	563	688	376	444	189
junge Blätter	237	29	58	108	159	51	135	280	97	139	357
source-Blätter	248	34	48	143	133	48	127	299	119	160	442
seneszente Blätter	218	47	293	176	263	20	248	134	55	55	360
Stengel	204	30	78	123	142	56	235	504	473	233	187
Blüte, Stadium 9	133	27	206	105	112	99	201	559	418	424	147
Blüte, Stadium 10/11	189	36	164	111	105	72	185	402	264	290	183
Blüte, Stadium 12	151	31	215	108	135	77	225	391	315	297	158
Blüte, Stadium 15	184	30	210	119	206	51	235	187	167	163	259
Schote, Stadium 2	113	39	121	101	140	110	116	217	242	196	240
Schote, Stadium 3 (globulärer Embryo)	139	37	72	78	157	85	183	361	305	261	191
Schote, Stadium 4 (Herz-Embryo)	76	38	48	89	150	52	207	466	679	540	68
Schote, Stadium 5 (Dreiecks-Embryo)	48	85	67	95	126	68	142	431	789	596	57
Samen, Stadium 6 (Torpedo-Embryo)	33	179	51	68	62	93	78	337	944	614	54
Samen, Stadium 7 (Spazierstock-Embryo)	32	267	58	59	76	93	62	210	713	406	62
Samen, Stadium 8 (früh entwickelte Cotyledonen)	14	1594	68	63	10	70	56	24	155	63	132
Samen, Stadium 9 (frühe grüne Cotyledonen)	15	1605	58	70	11	49	54	20	86	48	106
reife Samen, Stadium 10 (grüne Cotyledonen)	15	1888	78	81	8	68	57	7	72	37	95

Diese Daten weisen nach, dass in allen Geweben PFK-Gene exprimiert werden, und so für die Glycolyse zur Verfügung stehen. Allerdings können post-transkriptionale und post-translationale Modifikationen der PFK-Gene, die die Proteinmengen regulieren, nicht ausgeschlossen werden. Diese würden sich ebenfalls auf die Gesamt-Aktivität auswirken. Es

ist außerdem denkbar, dass durch unterschiedliche Untereinheiten-Zusammensetzung die Aktivität der PFK reguliert wird. So wurde postuliert, dass die Bildung großer Komplexe bei den PFKs dann auftritt, wenn das Enzym aktiviert wird (Wong et al. 1987). Es werden daher in Zukunft weitere umfangreiche Untersuchungen zur Expression der PFKs benötigt.

Tab. 28: Microarray-Analyse der Phosphofructokinase-Gene in Wurzeln und Sprossen von *Arabidopsis*-Pflanzen bei verschiedenen Stressbedingungen (Daten aus der Internetseite www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de). ↑ Erhöhung der Expression innerhalb von 24 h Stressexposition, ↓ Verminderung der Expression innerhalb von 24 h Stressexposition.

	Osmotischer				Oxidativer			
	Kälte	Stress	Salz	Trockenheit	Stress	Hitze	UVB	Verwundung
Wurzeln								
PFK_1	↓	=	=	=	=	↑	=	=
PFK_2	=	↑	=	=	=	=	=	=
PFK_3	=	=	=	=	=	↑	=	=
PFK_4	↓	↑	=	=	=	=	=	=
PFK_5	↓	↓	↓	=	=	↓	=	=
PFK_6	=	=	=	=	=	=	=	=
PFK_7	↑	=	=	=	=	↑	=	=
PFP_A1	=	↓	↓	=	=	↓	=	=
PFP_A2	=	↓	=	=	=	↓	=	=
PFP_B1	=	↓	↓	=	=	↓	=	=
PFP_B2	=	=	=	=	=	=	=	=
Blätter								
PFK_1	↓	=	=	=	=	=	=	=
PFK_2	=	↑	=	=	=	=	=	=
PFK_3	=	↑	=	=	=	↑	↑	=
PFK_4	↓	↑	=	=	=	=	=	=
PFK_5	=	↑	=	=	=	↓	=	=
PFK_6	=	↓	=	=	=	=	=	=
PFK_7	↑	↑	↑	=	=	↑	↑	=
PFP_A1	=	↓	=	=	=	↓	=	=
PFP_A2	=	↓	=	=	=	↓	↑	=
PFP_B1	=	↓	=	=	=	↓	=	=
PFP_B2	↓	↓	↓	=	=	=	=	=

Stressbedingungen sollten durch erhöhten Energiebedarf in einer erhöhten Glycolyse-Rate resultieren. Demzufolge erwarten wir zumindest bei einigen Stress-Bedingungen eine Induktion verschiedener Phosphofructokinase-Gene. Eine Ausgangshypothese war, dass bei ATP-Mangel, wie er z.B. bei Phosphat- oder Sauerstoffmangel auftritt, die PFP die PFK ersetzen könnte. Bisher waren solche vergleichenden Untersuchungen nur anhand von Messung der Enzymaktivitäten durchführbar (z.B. Gibbs et al. 2000, Kato-Noguchi 2002, Mustroph und Albrecht 2003). Nach den neuen Erkenntnissen ist auch eine Analyse der Phosphofructokinasen auf RNA-Ebene möglich.

Die Ähnlichkeit der pflanzlichen PFKs mit den PFPs führte dazu, dass in Datenbanken und Microarray-Analysen häufig beide Enzymgruppen miteinander vermischt wurden (z.B. Liu et al. 2005, Loreti et al. 2005). Nach den neuen Erkenntnissen über die Phosphofructokinase-Familie können nun diese Ergebnisse nach PFP und PFK getrennt werden. Für viele PFKs ist eine Induktion durch Stress zu beobachten. Zum Beispiel wird PFK7 in Blättern und Wurzeln durch Kältestress induziert (Tab. 28). Hitze und osmotischer Stress rufen ebenfalls die Induktion einiger PFK-Gene hervor. In drei Microarray-Experimenten zu Sauerstoffmangel wurden PFK3 und PFK6 leicht induziert (Tab. 24, Liu et al. 2005, Loreti et al. 2005, Dongen, pers. Mitteilung). Im Gegensatz dazu werden die mRNA-Mengen der 4 PFP-Gene bei vielen Stressbedingungen nicht induziert, und sinken sogar teilweise in der Expressionsmenge (Tab. 28). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass auch die PFP in *Arabidopsis*, wie schon für Kartoffel vermutet, keine wesentliche Funktion in der Glycolyse hat.

4.6 Ausblick

Mit den hier vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Ethanol-Bildung zur Aufrechterhaltung der Glycolyse für das Überleben der Pflanzen unter Sauerstoffmangel sehr wichtig ist. Auch photosynthetische Prozesse spielen eine große Rolle bei der Anoxie-Toleranz. In Zukunft sollten besonders zu letzterem Punkt genauere Versuche erfolgen, die vor allem den zyklischen Elektronentransport unter Anoxie aufklären helfen.

Während der Experimente zur Thematik der Nutzung von PPi als alternativer Energiedonor konnte bestätigt werden, dass die Saccharose-Spaltung insbesondere bei Energie-Mangel durch den alternativen Weg über SuSy und UGPase ablaufen kann. Die PFP hat in Überflutungs-sensitiven Kartoffeln unter Hypoxie keine essentielle Funktion. Um Bedingungen zu finden, in denen die PFP wichtig ist, sind weitere Versuche mit den PFP-RNAi-Pflanzen sowie den F2,6BP-RNAi-Pflanzen nötig.

Die in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen der pflanzlichen PFKs eröffnen ebenfalls ein neues Feld für weitere Experimente. Neben der grundlegenden Untersuchung weiterer Eigenschaften der PFKs wie Komplexbildung oder Promotor-Eigenschaften sind aber auch andere interessante Ansätze möglich. Eine antisense- oder RNAi-Hemmung der PFKs kann durchgeführt werden, um deren Rolle in der Glycolyse herauszufinden. Durch solche Pflanzen könnte außerdem die Bedeutung der PFP weiter untersucht werden, falls sie in der Lage ist, einen Mangel an PFK zu kompensieren.

Literaturverzeichnis

- Aberle NS, Ren J (2003) Short-term acetaldehyde exposure depresses ventricular myocyte contraction: Role of cytochrome P450 oxidase, xanthine oxidase, and lipid peroxidation. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 577-583
- Ahmed S, Nawata E, Hosokawa M, Domae Y, Sakuratani T (2002) Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Sci* 163: 117-123
- Albrecht G, Biemelt S (1998) A comparative study on carbohydrate reserves and ethanolic fermentation in the roots of two wetland and non-wetland species after commencement of hypoxia. *Physiol Plant* 104: 81-86
- Albrecht G, Biemelt S, Baumgartner S (1997) Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytol* 136: 137-144
- Albrecht G, Kammerer S, Praznik W, Wiedenroth EM (1993) Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum*) under hypoxia and following re-aeration. *New Phytol* 123: 471-476
- Albrecht G, Mustroph A, Fox TC (2004) Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiol Plant* 120: 93-105
- Albrecht G, Mustroph A (2003) Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased *in situ* activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta* 217: 252-260
- Albrecht G, Wiedenroth EM (1994) Is long-term hypoxia met by the Pasteur effect in roots of wheat seedlings? *Proc Roy Soc Edinburgh* 102b: 407-412
- Alves AM, Euverink GJ, Santos H, Dijkhuizen L (2001) Different physiological roles of ATP- and PP(i)-dependent phosphofructokinase isoenzymes in the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *J Bacteriol* 183: 7231-7240
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Waiscott M, Delmer DP (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9353-9357
- Andrews DL, MacAlpin DM, Cobb BG, Johnson JR, Drew MC (1994) Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol* 106: 1575-1582
- Antal TK, Krendeleva TE, Laurinavichene TV, Makarova VV, Ghirardi ML, Rubin AB, Tsygankov AA, Seibert M (2003) The dependence of algal H₂ production on photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochim Biophys Acta* 1607: 153-160
- Armstrong W (1979) Aeration in higher plants. *Adv Bot Res* 7: 225-232
- Arpagaus S, Brändle R (2000) The significance of α -amylase under anoxia stress in tolerant rhizomes (*Acorus calamus* L.) and non-tolerant tubers (*Solanum tuberosum* L., var. Desiree). *J Exp Bot* 51: 1475-1477
- Atkinson DE (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem* 7: 4030-4034
- Atwell BJ, Thomson CJ, Greenway H, Ward G (1985) A study of the impaired growth of roots of *Zea mays* seedlings at low oxygen concentration. *Plant Cell Env* 8: 179-188

-
- Avadhani PN, Greenway H, Lefroy R, Prior L (1978) Alcoholic fermentation and malate metabolism in rice germinating at low oxygen concentrations. *Aust J Plant Physiol* 5: 15-25
- Bapteste E, Moreira D, Philippe H (2003) Rampant horizontal gene transfer and phospho-donor change in the evolution of the phosphofructokinase. *Gene* 318: 185-191
- Barclay AM, Crawford RMM (1983) The effect of anaerobiosis on carbohydrate levels in storage tissues of wetland plants. *Ann Bot* 51: 255-259
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant J* 21: 73-81
- Bendall DS, Manasse RS (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim Biophys Acta* 1229: 23-38
- Bergmeyer H (1983) *Methods of enzymatic analysis* Verlag Chemie, Weinheim
- Bertani A, Brambilla I (1982a) Effect of decreasing oxygen concentration on some aspects of protein and amino acid metabolism in rice roots. *Z Pflanzenphysiol* 107: 193-200
- Bertani A, Brambilla I (1982b) Effect of decreasing oxygen concentration on wheat roots: growth and induction of anaerobic metabolism. *Z Pflanzenphysiol* 108: 283-288
- Bertani A, Brambilla I, Menegus F (1980) Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate, and fate of fermentation products. *J Exp Bot* 31: 325-331
- Bertani A, Brambilla I, Menegus F (1981) Effect of anaerobiosis on carbohydrate content in rice roots. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 176: 835-840
- Bertrand A, Castonguay Y, Nadeau P, Laberge S, Michaud R, Belanger G, Rochette P (2003) Oxygen deficiency affects carbohydrate reserves in overwintering forage crops. *J Exp Bot* 54: 1721-1730
- Biemelt S, Hajirezaei MR, Melzer M, Albrecht G, Sonnewald U (1999) Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. *Planta* 210: 41-49
- Biemelt S, Keetman U, Mock H-P, Grimm B (2000) Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. *Plant Cell Env* 23: 135-144
- Biemelt S, Keetmann U, Albrecht G (1998) Re-aeration following anoxia leads to activation of the antioxidative defence system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol* 116: 651-658
- Bijnen FGC, Zuckermann H, Harren FJM, Reuss J (1998) Multi-component trace-gas analysis by three intracavity photoacoustic cells in a CO laser: observation of anaerobic and post-anaerobic emission of acetaldehyde and ethanol in cherry tomatoes. *App Optics* 37: 3345-3353
- Blackwell PS (1983) Measurements of aeration in waterlogged soils: Some improvements of techniques and their application to experiments using lysimeters. *J Soil Sciences* 34: 271-285
- Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV (2001) Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *J Exp Bot* 52: 1179-1190
- Boamfa EI, Ram PC, Jackson MB, Reuss J, Harren FJM (2003) Dynamic aspects of alcoholic fermentation of rice seedlings in response to anaerobiosis and to complete submergence: relationship to submergence tolerance. *Ann Bot* 91: 279-290

- Bonini MG, Miyamoto S, Mascio PD, Augusto O (2004) Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J Biol Chem* 279: 51836-51843
- Botha AM, Botha FC (1991) Pyrophosphate dependent phosphofructokinase of *Citrullus lanatus*: molecular forms and expression of subunits. *Plant Physiol* 96: 1185-1192
- Botha AM, Botha FC (1993) Effect of the radicle, and hormones on the subunit composition and molecular form of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in the cotyledons of *Citrullus lanatus*. *Aust J Plant Physiol* 20: 265-273
- Botha AM, Botha FC (1993) Induction of pyrophosphate-dependent phospho-fructokinase in watermelon (*Citrullus lanatus*) cotyledons coincides with insufficient cytosolic D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase to sustain gluconeogenesis. *Plant Physiol* 101: 1385-1390
- Botha FC, Cawood MC, Small JGC (1988) Kinetic properties of the ATP-dependent phosphofructokinase isoenzymes from cucumber seeds. *Plant Cell Physiol* 29: 415-421
- Bouny JM, Saglio PH (1996) Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pre-treatment. *Plant Physiol* 111: 187-197
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bucher M, Braendle R, Kuhlemeier C (1996) Glycolytic gene expression in amphibious *Acorus calamus* L. under natural conditions. *Plant & Soil* 178: 75-82
- Caemmerer S von, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387
- Carlisle SM, Blakeley SD, Hemmingsem SM, Trevanion SJ, Hiyoshi T, Kruger NJ, Dennis DT (1990) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. Conservation of protein sequence between the alpha- and beta- subunits and with the ATP-dependent phosphofructokinase. *J Biol Chem* 265: 18366-18371
- Carlson SJ, Chourey P (1996) Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol Gen Genet* 252: 303-310
- Carlson SJ, Chourey PS, Helentjaris T, Datta R (2002) Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol Biol* 49: 15-29
- Carnal NW, Black CC (1979) Pyrophosphate dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves. *Biochem Biophys Res Comm* 86: 20-26
- Carystinos GD, Heather MR, Monroy AF, Rajinder DS, Poole RJ (1995) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol* 108: 641-649
- Cawood MC, Botha FC, Small JGC (1988) Properties of the phosphofructokinase isoenzymes from germinating cucumber seeds. *J Plant Physiol* 132: 204-209
- Chang WWP, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JKM (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol* 122: 295-318
- Chen PS, Toribara TY, Warner H (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal Chemistry* 28: 1756-1758
- Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Börnke F (2005) Decreased sucrose-6-

- phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* 221: 479-492
- Chen YC, Chourey PS (1989) Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theor Appl Gen* 78: 553-559
- Chi A, Kemp RG (2000) The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate? *J Biol Chem* 275: 35677-35679
- Chourey PS, Chen Y-C, Miller ME (1991) Early cell degeneration in developing endosperm is unique to the shrunken mutation in maize. *Maydica* 36: 141-146
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol Gen Genet* 259: 88-96
- Christopher ME, Good AG (1996) Characterization of hypoxically inducible lactate dehydrogenase in maize. *Plant Physiol* 112: 1015-1022
- Church G, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-1995
- Clark LH, Harris WM (1981) Observation on the root anatomy of rice. *Am J Bot* 68: 154-161
- Clevering OA, Van Vierssen W, Blom CWPM (1995) Growth, photosynthesis and carbohydrate utilization in submerged *Scirpus maritimus* L. during spring growth. *New Phytol* 130: 105-116
- Colmer TD (2003) Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant Cell Env* 26: 17-36
- Cossins EA (1978) Ethanol metabolism in plants. In: Hook DD, Crawford RMM: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 169-202
- Costa dos Santos A, da Silva WS, de Meis L, Galina A (2003) Proton transport in maize tonoplasts supported by fructose-1,6-bisphosphate cleavage. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase as a pyrophosphate-regenerating system. *Plant Physiol* 133: 885-892
- Cox MC, Benschop JJ, Vreeburg RA, Wagemaker CA, Moritz T, Peeters AJ, Voesenek LA (2004) The roles of ethylene, auxin, abscisic acid, and gibberellin in the hyponastic growth of submerged *Rumex palustris* petioles. *Plant Physiol* 136: 2948-2960
- Crawford RMM (1992) Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. In: Begon M, Fitter AH: *Adv Ecol Res* London: Academic Press, 93-185
- Crawford RMM, Brändle R (1996) Oxygen deprivation stress in a changing environment. *J Exp Bot* 47: 145-159
- Crawford RMM, Walton JC, Wollenweber-Ratzer B (1994) Similarities between post-ischaemic injury to animal tissues and post anoxic injury in plants. *Proc Roy Soc Edinburgh* 102b: 325-332
- Crespi MD, Zabaleta EJ, Pontis HG, Salerno GL (1991) Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat. *Plant Physiol* 96: 887-891
- Dancer JE, ap Rees T (1989) Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta* 178: 421-424
- Das A, Uchimiya H (2002) Oxygen stress and adaptation of a semi-aquatic plant: rice (*Oryza sativa*). *J Plant Res* 115: 315-320
- Davies DD (1980) Anaerobic metabolism and production of organic acids. In: Stumpf, Conn: *The*

Biochemistry of plants: A Comprehensive Treatise

- Davies DD, Grego S, Kenworthy P (1974) The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta* 118: 297-310
- Davies JM, Poole RJ, Sanders D (1993) The computed free energy charge of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1141: 29-36
- de Sousa CAF, Sodek L (2002) The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Braz J Plant Physiol* 14: 83-94
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198: 460-470
- Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J Exp Bot* 51: 89-97
- Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* 131: 1529-1543
- Draborg H, Villadsen D, Nielsen TH (1999) Cloning, characterization and expression of a bifunctional fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from potato. *Plant Mol Biol* 39: 703-720
- Draborg H, Villadsen D, Nielsen TH (2001) Transgenic Arabidopsis plants with decreased activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase have altered carbon partitioning. *Plant Physiol* 126: 750-758
- Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 223-250
- Drew MC, Jackson MB, Giffard SC, Campbell R (1981) Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta* 153: 217-224
- Drew MC, Lynch JM (1980) Soil anaerobiosis, micro-organisms and root function. *Annu Rev Phytopathology* 18: 37-66
- Ella ES, Kawano N, Ito O (2003) Importance of active oxygen-scavenging system in the recovery of rice seedlings after submergence. *Plant Sci* 165: 85-93
- Ellis MH, Dennis ES, Peacock WJ (1999) Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol* 119: 57-64
- Ellis MH, Millar AA, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) over-expressing alcohol dehydrogenase shows increased ethanol fermentation but no increase in tolerance to oxygen deficiency. *Aust J Plant Physiol* 27: 1041-1050
- Else MA, Coupland D, Dutton L, Jackson MB (2001) Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiol Plant* 111: 46-54
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-1016
- Enomoto T, Ohyama H, Kodama M (1992) Purification and characterization of pyrophosphate: D-D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase from rice seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 251-256

- Farineau J (1999) Study of the non-photochemical dark rise in chlorophyll fluorescence in pre-illuminated leaves of various C3 and C4 plants submitted to partial anaerobiosis. *Plant Physiol Biochem* 37: 911-918
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* 7: 254-261
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263
- Fox TC, Mujer CV, Andrews DL, Williams AS, Cobb BG, Kennedy RA, Rumpho ME (1995) Identification and gene expression of anaerobically induced enolase in *Echinochloa phyllopogon* and *Echinochloa crus-galli*. *Plant Physiol* 109: 433-443
- Fridman E, Zamir D (2003) Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 603-609
- Frostchristensen H, Sandjensen K (1995) Comparative kinetics of photosynthesis in floating and submerged *Potamogeton* leaves. *Aqu Bot* 51: 121-134
- Fukao T, Kennedy RA, Yamasue Y, Rumpho ME (2003) Genetic and biochemical analysis of anaerobically-induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia. *J Exp Bot* 54: 1421-1429
- Garland WJ, Dennis DT (1980a) Plastid and cytosolic phosphofructokinase from the developing endosperm of *Ricinus communis*. I. Separation, purification and initial characterization of the isoenzymes. *Arch Biochem Biophys* 204: 302-309
- Garland WJ, Dennis DT (1980b) Plastid and cytosolic phosphofructokinase from the developing endosperm of *Ricinus communis*. II. Comparison of the kinetic and regulatory properties of the isoenzymes. *Arch Biochem Biophys* 204: 310-317
- Garnaczarska M, Bednarski W (2004) Effect of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots. *Plant Physiol Biochem* 42: 233-240
- Garstka M, Nejman P, Rosiak M (2004) The action of oxygen on chlorophyll fluorescence quenching and absorption spectra in pea thylakoid membranes under the steady-state conditions. *J Photochem Photobiol B: Biology* 77: 79-92
- Geffers R, Cerff R, Hehl R (2000) Anaerobiosis-specific interaction of tobacco nuclear factors with cis-regulatory sequences in the maize GapC4 promoter. *Plant Mol Biol* 43: 11-21
- Geigenberger P (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol* 6: 247-256
- Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol Chem* 381: 723-740
- Geigenberger P, Hajirezaei M, Geiger M, Deiting U, Sonnewald U, Stitt M (1998) Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers. *Planta* 205: 428-437
- Geißler N, Schnetter R, Schnetter ML (2002) The pneumathodes of *Laguncularia racemosa*: Little known rootlets of surprising structure, and notes on a new fluorescent dye for lipophilic substances. *Plant Biol* 4: 729-739
- Germain V, Ricard B, Raymond P, Saglio PH (1997) The role of sugars, hexokinase and sucrose

- synthase in the determination of hypoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. *Plant Physiol* 114: 167-175
- Gibbs J, Greenway H (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Funct Plant Biol* 30: 1-47
- Gibbs J, Morrell S, Valdez A, Setter TL, Greenway H (2000) Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J Exp Bot* 51: 785-796
- Good AG, Crosby WL (1989) Induction of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in hypoxically induced barley. *Plant Physiol* 90: 860-866
- Good AG, Münch DG (1993) Long-term anaerobic metabolism in root tissue: metabolic products of pyruvate metabolism. *Plant Physiol* 101: 1163-1168
- Greenway H, Gibbs J (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Funct Plant Biol* 30: 999-1036
- Grichko VP, Glick BR (2001) Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, rolD or PRB 1b promoter. *Plant Physiol Biochem* 39: 19-25
- Guglielminetti L, Perata P, Alpi A (1995) Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiol* 108: 735-741
- Gunawardena A, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001) Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.): *Planta* 212: 205-214
- Hajirezaei M (1993) Die Bedeutung von Pyrophosphat:Fructose-6-P Phosphotranferase und anorganischem Pyrophosphat im pflanzlichen Stoffwechsel. Dissertation, Bayreuth
- Hajirezaei M, Sonnewald U (1999) Inhibition of potato tuber sprouting: low levels of cytosolic pyrophosphate lead to non-sprouting tubers harvested from transgenic potato plants. *Potato research* 4: 2353-372
- Hajirezaei M, Sonnewald U, Viola R, Carlise S, Dennis D, Stitt M (1994) Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta* 192: 16-33
- Haldimann P, Strasser RJ (1999) Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynth Res* 62: 67-83
- Hampp R (1985) ADP, AMP: luminometric method. Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim. 371-379
- Hänsch R, Mendel RR, Cerff R, Hehl R (2003) Light-dependent anaerobic induction of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 (GapC4) promoter in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Ann Bot* 91: 149-154
- Harris GC, Heber U (1993) Effects of anaerobiosis on chlorophyll fluorescence yield in spinach (*Spinacia oleracea*) leaf discs. *Plant Physiol* 101: 1169-1173
- Hausler RE, Holtum JA, Latzko E (1987) Cytosolic ATP-dependent phosphofructokinase from spinach. *Plant Physiol* 84: 205-207
- Hausler RE, Holtum JA, Latzko E (1989a) Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves. I. Purification, characteristics, and regulation. *Plant Physiol* 90: 1498-1505

-
- Hausler RE, Holtum JA, Latzko E (1989b) Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves. II. Affinity for Mg^{2+} and nucleoside phosphates. *Plant Physiol* 90: 1506-1512
- Heber U (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth Res* 73: 223-231
- Hiron RW, Wright STC (1973) The role of endogenous abscisic acid in the response of plants to stress. *J Exp Bot* 24: 769-781
- Hodgson AS, Chan KY (1982) The effect of short-term waterlogging during furrow irrigation on cotton in a cracking grey clay. *Austral J Agricultur Res* 33: 109-116
- Höfgen R, Willmitzer L (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci* 66: 221-230
- Höfnagel MHN, Atkin OK, Wiskich JT (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim Biophys Acta* 1366: 235-255
- Holmer M, Bondgaard EJ (2001) Photosynthetic and growth response of eelgrass to low oxygen and high sulfide concentrations during hypoxic events. *Aqu Bot* 70: 29-38
- Horlacher R, Poskuta J (1986) Der Einfluß der Wurzelanaerobiose auf Ethanol-, Laktat- und Glukose-Gehalte sowie auf die Aktivitäten von ADH und LDH in Weizenkeimpflanzen. *Biol Plant* 28: 130-136
- Huber SC (1986) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 37: 233-246
- Hwang YS, Thomas BR, Rodriguez RL (1999) Differential expression of rice alpha-amylase genes during seedling development under anoxia. *Plant Mol Biol* 40: 911-920
- Isaac JE, Rhodes MJC (1982) Purification and properties of phosphofructokinase from fruits of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* 21: 1553-1556
- Ismond KP, Dolferus R, De Pauw M, Dennis ES, Good AG (2003) Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol* 132: 1292-1302
- Ivanov B, Edwards G (2000) Influence of ascorbate and the Mehler peroxidase reaction on non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in maize mesophyll chloroplasts. *Planta* 210: 765-774
- Iyer MG, Surendranathan KK, Nair PM (1989a) Correlation between increase in 6-phosphofructokinase activity and appearance of three multiple forms in ripening banana. *Plant Physiol Biochem* 27: 99-106
- Iyer MG, Surendranathan KK, Nair PM (1989b) Evidence for the formation of lower molecular weight forms of phosphofructokinase in ripening banana by dissociation of oligomeric form. *Plant Physiol Biochem* 27: 483-486
- Jackson MB, Armstrong W (1999) Formation of aerenchyma and the process of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biol* 1: 274-287
- Jackson MB, Hall KC (1987) Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits. *Plant Cell Env* 10: 121-130
- Jackson MB, Herman B, Goodenough A (1982) An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant Cell Env* 5: 163-172
- Jackson MB, Ram PC (2003) Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Ann Bot* 91: 227-241
- Jackson MB, Saker LR, Crisp CM, Else MA, Janowiak F (2003) Ionic and pH signalling from roots to

- shoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant & Soil* 253: 103-113
- Jacobs M, Dolferus R, Van den Bossche D (1988) Isolation and biochemical analysis of ethyl methanesulfonate-induced alcohol dehydrogenase null mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Biochem Genet* 26: 105-122
- Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, Hajirezaei M, Stitt M (1992) Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol. *Planta* 188: 238-244
- Joet T, Cerovic Z, Rumeau D, Cournac L, Guedeney G, Horvath EM, Medgyesy P, Peltier G (1998) Increased sensitivity of photosynthesis to anaerobic conditions induced by targeted inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. In: Garab G. *Photosynthesis: Mechanism and Effects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1967-1970
- Joet T, Cournac L, Peltier G, Havaux M (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants. *In vivo* control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol* 128: 760-769
- Johnson JR, Cobb BG, Drew MC (1994) Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* null *Zea mays* L. *Plant Physiol* 105: 61-67
- Justin SHFW, Armstrong W (1987) The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytol* 106: 265-270
- Kapri R, Sadka A (1998) PPI-dependent phosphofructokinase in citrus fruit. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P (2005) Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells. *Trends Plant Sci* 10: 103-105
- Kato-Noguchi H (2002) The catalytic direction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in rice coleoptiles in anoxia. *Physiol Plant* 116: 345-350
- Kato-Noguchi H, Watada AE (1996) Low-oxygen atmosphere increases fructose-2,6-bisphosphatase in fresh-cut carrots. *J Amer Soc Hort Sci* 121: 307-309
- Kato-Nohuchi H, Yamada K, Hasegawa K (2001) Lepidimic acid increases fructose-2,6-bisphosphate in *Amaranthus* seedlings. *Phytochemistry* 56: 499-503
- Kawano N, Ella E, Ito O, Yamauchi Y, Tanaka K (2002) Comparison of adaptability to flash flood between rice cultivars differing in flash flood tolerance. *Soil Sci Plant Nutr* 48: 659-665
- Kelly GJ, Latzko E (1977) Chloroplast phosphofructokinase. II. Partial purification, kinetic and regulatory properties. *Plant Physiol* 60: 295-299
- Kemp RG, Tripathi RL (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose-1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 5723-5724
- Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC (1992) Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol* 100: 1-6
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H (2004) UDP-Glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol* 134: 912-918
- Knowles VL, Greyson MF, Dennis DT (1990) Characterization of ATP-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase isozymes from leaf and endosperm tissues of *Ricinus communis*. *Plant Physiol* 92: 155-159
- Kobayashi M, Funane K, Ohya S, Torikoshi H, Kurogi M, Ishiuchi D (1992) Pyrophosphate-dependent

- phosphofructokinase: its oligomeric forms in mature green tomato fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 54-57
- Kohler U, Liaud MF, Mendel RR, Cerff R, Hehl R (1995) The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol Biol* 29: 1293-1298
- Kombrink E, Kruger NJ (1984) Inhibition by metabolic intermediates of pyrophosphate:fructose 6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Z Pflanzenphysiol* 114: 443-453
- Kombrink E, Kruger NJ, Beevers H (1984) Kinetic properties of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol* 74: 395-401
- Komina O, Zhou Y, Sarath G, Chollet R (2002) In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase. *Plant Physiol* 129: 1664-1673
- Kowalczyk S (1987) The characteristics of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferases from *Sansevieria trifasciata* leaves and *Phaseolus coccineus* stems. *Acta Biochim Pol* 34: 253-268
- Kozlowski TT, Pallardy SG (1984) Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relations. In: Kozlowski TT: *Flooding and Plant Growth*. New York: Academic Press, 165-181
- Kreuzwieser J, Harren FJM, Laarhoven LJJ, Boamfa EI, Lintel-Hekkert S, Scheerer U, Hueglin C and Rennenberg H (2001) Acetaldehyde emission by the leaves of trees – correlation with physiological and environmental parameters. *Physiol Plant* 113: 41-49
- Kreuzwieser J, Scheerer U, Rennenberg H (1999) Metabolic origin of acetaldehyde emitted by trees. *J Exp Bot* 50: 757-765
- Krishnan P, Ramakrishnayya G (1999) Survival of rice during complete submergence: effect of potassium bicarbonate application. *Aust J Plant Physiol* 26: 793-800
- Kruger NJ, Dennis DT (1987) Molecular properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tuber. *Arch Biochem Biophys* 256: 273-279
- Kruger NJ, Hammond JBW (1988) Molecular comparison of pyrophosphate- and ATP-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferases from potato tuber. *Plant Physiol* 86: 645-648
- Kruger NJ, Hammond JBW, Burrell MM (1988) Molecular characterization of four forms of phosphofructokinase purified from potato tuber. *Arch Biochem Biophys* 267: 690-700
- Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SEM, Harthill JE, Nielsen TH, MacKintosh C (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J* 37: 654-667
- Ladygin VG, Semenova GA (1999) Functional activity and the structure of chloroplasts in pea leaves under root hypoxia and anoxia. *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya* 2: 163-174
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Larondelle Y, Mertens E, Van Schaftingen E, Hers HG (1986) Purification of spinach leaf phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase. *Eur J Biochem* 161: 351-357

- Lemke-Keyes CA, Sachs MM (1989) Anaerobic tolerant null: a mutant that allows Adh1 nulls to survive anaerobic treatment. *J Hered* 80: 316-319
- Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA (2000) Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicals. *Plant Physiol* 122: 597-608
- Liao CT, Lin CH (1996) Photosynthetic response of grafted bitter melon seedlings to flood stress. *Environ Exp Bot* 36: 167-172
- Liao CT, Lin CH (2001) Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proc Natl Sci Counc ROC (B)* 25: 148-157
- Liu F, VanToai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, Quackenbush J (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 1115-1129
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 163: 16-20
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. *Plant Physiol* 137: 1130-1138
- Mahajan R, Singh R (1989) Properties of pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate phosphotransferase from endosperm of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Plant Physiol* 91: 421-426
- Mahajan R, Singh R (1992) Properties of ATP-dependent phosphofructokinase from endosperm of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *J Plant Biochem Biotechnol* 1: 45-48
- Maraña C, Garcia-Olmedo F, Carbonero P (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. *Gene* 88: 167-172
- Markham JE, Kruger NJ (2002) Kinetic properties of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from spinach leaves. *Eur J Biochem* 269: 1267-1277
- Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolism of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J* 4: 367-377
- Mayne RG, Kende H (1986) Glucose metabolism in anaerobic rice seedlings. *Plant Sci* 4: 531-36
- McDonald MP, Galwey NW, Colmer TD (2002) Similarity and diversity in adventitious root anatomy as related to root aeration among a range of wetland and dryland grass species. *Plant Cell Env* 25: 441-451
- McManmon M, Crawford RMM (1971) A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behaviour. *New Phytol* 70: 299-306
- MDR (2002) Katastrophen-Jahr für deutsche Landwirte. Nachrichten-Seite des MDR: <http://www.mdr.de/hochwasser/folgen-wirtschaft/245471.html>
- Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G (1989) Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance of anoxia. *Plant Physiol* 90: 29-33
- Menegus F, Cattaruzza L, Mattana M, Beffagna N, Ragg E (1991) Response to anoxia in rice and

- wheat seedlings. *Plant Physiol* 95: 760-767
- Mertens E (1991) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett* 285: 1-5
- Mertens E, Lador US, Lee JA, Miretsky A, Morris A, Rosario C, Kemp RG, Müller M (1998) The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases. *J Mol Evol* 47: 739-750
- Mertens E, Laroundelle Y, Hers H-G (1990) Induction of pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase by anoxia in rice seedlings. *Plant Physiol* 93: 584-587
- Michels PAM, Chevalier N, Opperdoes FR, Rider MH, Rigden D (1997) The glycosomal ATP-dependent phosphofructokinase of *Trypanosoma brucei* must have evolved from an ancestral pyrophosphate dependent enzyme. *Eur J Biochem* 250: 698-704
- Millenaar FF, Lambers H (2003) The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biol* 5: 2-15
- Minhas D, Grover A (1999) Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Sci* 146: 41-51
- MLUR (2004a) Mitteilung des Ministeriums für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg: http://www.brandenburg.de/land/mlur/w/elbe_hw.htm
- MLUR (2004b) Mitteilung des Ministeriums für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg: <http://www.brandenburg.de/land/mlur/presse/f1202002.pdf>
- Mohanty B, Wilson PM, apRees T (1993) Effects of anoxia on growth and carbohydrate metabolism in suspension cultures of soybean and rice. *Phytochemistry* 34: 75-82
- Monk LS, Braendle R, Crawford RMM (1987) Catalase activity and post-anoxic injury in monocotyledonous species. *J Exp Bot* 38: 233-246
- Moons A (2003) Osgtu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Lett* 553: 427-432
- Moons A, Valcke R, Van Montagu M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C3 plant. *Plant J* 15: 89-98
- Moore SA, Ronimus RS, Roberson RS, Morgan HW (2002) The structure of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Structure* 106: 59-671
- Moorhead GBG, Plaxton WC (1992) Evidence for an interaction between cytosolic aldolase and the ATP- and pyrophosphate-dependent phosphofructokinases in carrot storage roots. *FEBS Lett* 313: 277-280
- Müller M, Lee JA, Gordon P, Gaasterland T, Sensen TW (2001) Presence of prokaryotic and eukaryotic species in all subgroups of the PPI-dependent group II phosphofructokinase protein family. *J Bacteriol* 183: 6714-6716
- Münch DG, Archibald OW, Good AG (1993) Hypoxic metabolism in wild rice (*Zizania palustris*): enzyme-induction and metabolite production. *Plant Physiol* 99: 165-171
- Mustroph A, Albrecht G (2003) Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: Fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. *Physiol Plant* 117: 508-520

- Nabben RHM, Blom CWPM, Voeselek LACJ (1999) Resistance to complete submergence in *Rumex* species with different life histories: the influence of plant size and light. *New Phytol* 144: 313-321
- Nair PM, Darak BG (1981) Identification of multiple forms of phosphofructokinase in ripening dwarf cavendish banana. *Phytochemistry* 20: 605-609
- Nakamura N, Suzuki Y, Suzuki H (1992) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from pollen: properties and possible roles in sugar metabolism. *Physiol Plant* 86: 616-622
- Nakazono M, Tsuji H, Li Y, Saisho D, Arimura Si, Tsutsumi N, Hirai A (2000) Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. *Plant Physiol* 124: 587-598
- Nielsen TH (1994) Pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from barley seedlings. Isolation, subunit composition and kinetic characterization. *Physiol Plant* 92: 311-321
- Nielsen TH, Rung JH, Villadsen D (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci* 9: 556-563
- Nielsen TH, Stitt M (2001) Tobacco transformants with strongly decreased expression of pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase expression in the base of their young growing leaves contain much higher levels of fructose-2,6-bisphosphate but no major changes in fluxes. *Planta* 214: 106-116
- Nolte KD, Koch KE (1993) Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol* 101: 899-905
- Pak C, Linus H, van der Plas W, Douwe de Boer A (1995) Importance of dormancy and sink strength in sprouting of onions (*Allium cepa*) during storage. *Physiol Plant* 94: 277-283
- Paul M, Sonnewald U, Hajirezaei M, Dennis D, Stitt M (1995) Transgenic tobacco plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase do not differ significantly from wild type in photosynthate partitioning, plant growth or their ability to cope with limiting phosphate, limiting nitrogen and suboptimal temperatures. *Planta* 196: 277-283
- Pavelic D, Arpagaus S, Rawyler A, Brandle R (2000) Impact of post-anoxia stress on membrane lipids of anoxia-pretreated potato cells. A re-appraisal. *Plant Physiol* 124: 1285-1292
- Peeters AJM, Cox MCH, Benschop JJ, Vreeburg RAM, Bou J, Voeselek LACJ (2002) Submergence research using *Rumex palustris* as a model: looking back and going forward. *J Exp Bot* 53: 391-398
- Peltier G, Cournac L (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol* 53: 523-550
- Perata P, Alpi A (1993) Plant responses to anaerobiosis. *Plant Sci* 93: 1-17
- Perata P, Guglielminetti L, Alpi A (1996) Anaerobic carbohydrate metabolism in wheat and barley, two anoxia-intolerant cereal seeds. *J Exp Bot* 47: 999-1006
- Perata P, Guglielminetti L, Alpi A (1997) Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Ann Bot* 79: 40-56
- Perata P, Pouzueta-Romero J, Akazawa T, Yamaguchi J (1992) Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* 188: 611-618
- Pfeiffer I, Kutschera U (1995) Sucrose metabolism and cell elongation in developing sunflower hypocotyls. *J Exp Bot* 46: 631-638

-
- Pfister-Sieber M, Brändle R (1994) Aspects of plant behaviour under anoxia and post-anoxia. *Proc Roy Soc Edinburgh* 102: 313-324
- Plaxton WC (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 185-214
- Podesta FE, Moorhead GBG, Plaxton WC (1994) Potato tuber pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: Effect of thiols and polyalcohols on its intrinsic fluorescence, oligomeric structure and activity in dilute solutions. *Arch Biochem Biophys* 313: 50-57
- Podesta FE, Plaxton WC (1994) Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* 194: 374-380
- Ponnamperuma FN (1972) The chemistry of submerged soils. *Adv Agron* 24: 29-96
- Pörs Y (1999) Anpassung von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) an Licht- und Chlorophyllmangel. HU Berlin, Dissertation
- Posewitz MC, Smolinski SL, Kanakagiri S, Melis A, Seibert M, Ghirardi ML (2004) Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 16: 2151-2163
- Pozueta-Romero J, Perata P, Akazawa T (1999) Sucrose–starch conversion in heterotrophic tissues of plants. *Crit Rev Plant Sci* 18: 489-525
- Pradet A, Bomsel JL (1978) Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia. In: Hook DD, Crawford RMM: *Plant Life in Anaerobic Environments*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 89-118
- Raghavendra AS, Padmasree K (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci* 8: 546-553
- Rahman M, Grover A, Peacock WJ, Dennis ES, Ellis MH (2001) Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Aust J Plant Physiol* 28: 1231-1241
- Ram PC, Singh AK, Singh BB, Singh VK, Singh HP, Setter TL, Singh VP, Singh RK (1999) Environmental characterization of floodwater in Eastern India: Relevance to submergence tolerance of lowland rice. *Exp Agric* 35: 141-152
- Ram PC, Singh BB, Singh AK, Ram P, Singh PN, Singh HP, Boamfa EI, Harren FJM, Santosa E, Jackson MB, Setter TL, Reuss J, Wade LJ, Singh VP, Singh RK (2002) Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice: prospects for germ plasm improvement through marker aided breeding. *Field Crop Res* 76: 131-152
- Ravenel J, Peltier G, Havaux M (1994) The cyclic electron pathways around photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined in vivo by photoacoustic measurements of energy storage. *Planta* 193: 251-259
- Reggiani R, Bertani A (2003) Anaerobic amino acid metabolism. *Russian J Plant Physiol* 50: 733-736
- Reggiani R, Nebuloni M, Mattana M, Brambilla I (2000) Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids* 18: 207-217
- Ricard B, Couée I, Raymond P, Saglio PH, Saint-Ges V, Pradet A (1994) Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol Biochem* 32: 1-10

- Ricard B, Rivoal J, Spiteri A, Pradet A (1991) Anaerobic stress induces the transcription of sucrose synthase in rice. *Plant Physiol* 95: 669-674
- Ricard B, Van Toai T, Chourey P, Saglio P (1998) Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiol* 116: 1323-1331
- Rivoal J, Hanson AD (1993) Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *Limonium*. *Plant Physiol* 101: 553-560
- Rivoal J, Hanson AD (1994) Metabolic control of anaerobic glycolysis: overexpression of lactate dehydrogenase in transgenic tomato roots supports the Davies-Roberts hypothesis and points to a critical role for lactate secretion. *Plant Physiol* 106: 1179-1185
- Rivoal J, Thind S, Pradet A, Ricard B (1997) Differential induction of pyruvate decarboxylase subunits and transcripts in anoxic rice seedlings. *Plant Physiol* 114: 1021-1029
- Roberts JKM, Andrade FH, Anderson IC (1985) Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiol* 77: 492-292
- Roberts JKM, Callis J, Jardetzky O, Walbot V, Freeling M (1984) Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6029-6033
- Roberts JKM, Callis J, Wemmer D, Walbot V, Jardetzky O (1984) Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3379-3383
- Roberts JKM, Hooks MA, Miaullis AP, Edwards S, Webster C (1992) Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 98: 480-487
- Rohacek K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definition, photosynthetic meaning, and mutual relationship. *Photosynthetica* 40: 13-29
- Rolletschek H, Weber H, Borisjuk L (2003) Energy status and its control on embryogenesis of legumes. Embryo photosynthesis contributes to oxygen supply and is coupled to biosynthetic fluxes. *Plant Physiol* 132: 1196-1206
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JDG (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* 20: 5556-5567
- Rung JH, Draborg HH, Jorgensen K, Nieslen TH (2004) Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Physiol Plant* 121: 204-214
- Sachs MM, Subbaiah CC, Sabb IN (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J Exp Bot* 47: 1-15
- Saglio PH (1985) Effect of path or sink anoxia on sugar translocation in roots of maize seedlings. *Plant Physiol* 77: 285-290
- Saglio PH, Drew MC, Pradet A (1988) Metabolic acclimation to anoxia by low (2-4 kPa partial pressure) oxygen pretreatment in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiol* 86: 61-66
- Salminen SO, Young RE (1975) The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiratory climacteric in banana fruit. *Plant Physiol* 55: 45-50
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York
- Schlüter U, Crawford RMM (2001) Long-term anoxia tolerance in leaves of *Acorus calamus* L. and *Iris*

- pseudacorus* L. J Exp Bot 52: 2213-2225
- Schlüter U, Crawford RMM (2003) Metabolic adaptation to prolonged anoxia in leaves of american cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Physiol Plant* 117: 492-499
- Schnarrenberger C, Krueger I (1986) Distinction between cytosol and chloroplast fructose-bisphosphate aldolase from pea, wheat and corn leaves. *Plant Physiol* 80: 301-304
- Schulte M (1993) Saisonale und interannuelle Variabilität des CO₂-Gaswechsels von Buchen (*Fagus sylvatica* L.) - Bestimmung von C-Bilanzen mit Hilfe eines empirischen Modells. Dissertation, Uni Göttingen
- Scott P, Lange AJ, Kruger NJ (2000) Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose-2,6-bisphosphate. *Planta* 211: 864-873
- Scott P, Lange AJ, Pilkis SJ, Kruger NJ (1995) Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose 2,6-bisphosphate levels. *Plant J* 7: 461-469
- Setter TL, Ella ES, Valdez AP (1994) Relationship between coleoptile elongation and alcoholic fermentation in rice exposed to anoxia. II. Cultivar differences. *Ann Bot* 74: 273-279
- Setter TL, Waters I, Atwell BJ, Kupkanchanakul T, Greenway H (1987) Carbohydrate status of terrestrial plants during flooding. In: Crawford RMM: Plant life in aquatic and amphibious habitats. British Ecological Society, Blackwell, Oxford
- Shiao TL, Ellis MH, Dolferus R, Dennis ES, Doran PM (2002) Overexpression of alcohol dehydrogenase or pyruvate decarboxylase improves growth of hairy roots at reduced oxygen concentrations. *Biotechnol Bioeng* 15: 455-461
- Shirakihara, Y, Evans PR (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J Mol Biol* 204: 973-994
- Siebers B, Klenk HP, Hensel R (1998) PPI-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *J Bacteriol* 180: 2137-2143
- Singh HP, Singh BB, Ram PC (2001) Submergence tolerance of rainfed lowland rice: search for the physiological marker traits. *J Plant Physiol* 158: 883-889
- Sonnewald U (1992) Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning in leaves. *Plant J* 2: 571-581
- Soukup A, Votrubova O, Cizkova H (2002) Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytol* 153: 277-287
- Sowokinos JR, Thomas C, Burrell MM (1997) Pyrophosphorylases in potato. V. Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. *Plant Physiol* 113: 511-517
- Springer B, Werr W, Starlinger P, Bennet DC, Zokolica M, Freeling M (1986) The shrunken gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. *Mol Gen Genet* 205: 461-468
- Steinhauser D, Usadel B, Luedemann A, Thimm O, Kopka J (2004) CSB.DB: a comprehensive systems-biology database. *Bioinformatics* 20: 3647-3651
- Stitt M (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 153-185

- Stitt M (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica Acta* 111: 167-175
- Stitt M, Bulpin PV, ap Rees T (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* 544: 200-214
- Stitt M, Lilley RMC, Gerhard R, Heldt HW (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol* 174: 518-552
- Summers JE, Ratcliff RG, Jackson MB (2000) Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. *J Exp Bot* 51: 1413-1422
- Sundby C (1990) Bicarbonate effects on photo-inhibition. Including an explanation for the sensitivity to photo-inhibition under anaerobic conditions. *FEBS Lett* 274: 77-81
- Surendranathan KK, Iyer MG, Nair PM (1990) Characterization of a monomeric phosphofructokinase from banana - role of magnesium in its regulation. *Plant Sci* 72: 27-35
- Surendranathan KK, Iyer MG, Nair PM (1992) Mechanism of action of a dimeric phosphofructokinase from banana: role of magnesium on its kinetics and regulation. *Plant Sci* 81: 29-36
- Suzuki J, Mutton MA, Ferro MIT, Lemos MVF, Pizauro FM, Mutton MJR, DiMauro SMZ (2003) Putative pyrophosphate phosphofructose 1-kinase genes identified in sugar cane may be getting energy from pyrophosphate. *Genet Mol Res* 2: 376-382
- Sweetlove LJ, Burrell MM, ap Rees T (1996) Characterization of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochem J* 320: 487-492
- Tadege M, Braendle R, Kuhlemeier C (1998) Anoxia tolerance in tobacco roots: effects of overexpression of pyruvate decarboxylase. *Plant J* 14: 327-335
- Teramoto M, Koshiishi C, Ashihara H (2000) Wound-induced respiration and pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase in potato tubers. *Z Naturforsch* 55: 953-956
- Terazawa K, Maruyama Y, Morikawa Y (1992) Photosynthetic and stomatal responses of *Larix kaempferi* seedlings to short-term waterlogging. *Ecol Research* 7: 193-197
- Thayer SS, Björkman O (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth Res* 23: 331-343
- Theodorou ME, Cornel FA, Duff SM, Plaxton WC (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J Biol Chem* 267: 21901-21905
- Theodorou ME, Kruger NJ (2001) Physiological relevance of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of spinach leaf pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase. *Planta* 213: 147-157
- Theodorou ME, Plaxton WC (1996) Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* 112: 343-351
- Thomson CJ, Atwell BJ, Greenway H (1989) Response of wheat seedlings to low O₂ concentrations in nutrient solution. I. Growth, O₂⁻ uptake and synthesis of fermentative end- products by root segments. *J Exp Bot* 40: 985-991
- Todd JF, Blakeley SD, Dennis DT (1995) Structure of the genes encoding the a and b-subunits of castor pyrophosphate-dependent Phosphofructokinase. *Gene* 152: 181-186

- Topa MA, McLeod KW (1986) Effects of anaerobic growth conditions on phosphorus tissue concentrations and absorption rates of southern pine seedlings. *Tree Physiol* 2: 327-340
- Tripodi KEJ, Podesta FE (1997) Purification and structural and kinetic characterization of the pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1 -phosphotransferase from the crassulacean acid metabolism plant, pineapple. *Plant Physiol* 113
- Truesdale MR, Toldi O, Scott P (1999) The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol* 121: 957-964
- Tsuji H, Meguro N, Suzuki Y, Tsutsumi N, Hirai A, Nakazono M (2003) Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice. *FEBS Lett* 546: 369-373
- Turner WL, Plaxton WC (2003) Purification and characterization of pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases from banana fruit. *Planta* 217: 113-121
- Umbreit WW, Burris RH, Stauffer JW (1951) Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co, Minneapolis 15, Minn
- Umeda M, Uchimiya H (1994) Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. *Plant Physiol* 106: 1015-1022
- Van Lis R, Atteia A (2004) Control of mitochondrial function via photosynthetic redox signals. *Photosynth Res* 79: 133-148
- Van Schaftingen E (1984) D-fructose 2,6-bisphosphate. In: Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 335-341
- Van Schaftingen E (1987) Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 59: 315-395
- Vartapetian BB, Jackson MB (1997) Plant adaptations to anaerobic stress. *Ann Bot* 79: 3-20
- Vella J, Copeland L (1993) Phosphofructokinase from the host fraction of soybean nodules. *J Plant Physiol* 141: 398-404
- Vergara BS, Jackson B, De Datta SK (1976) Deep water rice and its response to deepwater stress. International Rice Research Institute, Climate and Rice, Los Banos, Philippines, 301-319
- Villadsen D, Nielsen TH (2001) N-terminal truncation affects the kinetics and structure of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 359: 591-597
- Villadsen D, Rung JH, Draborg H, Nielsen TH (2000) Structure and heterologous expression of a gene encoding fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1492: 406-413
- Visser EJW, Blom CWPM, Voeselek LACJ (1996) Flooding-induced adventitious rooting in *Rumex*: morphology and development in an ecological perspective. *Acta Bot Neerl* 45: 17-28
- Voeselek LACJ, Blom CWPM (1989) Growth responses of *Rumex* species in relation to submergence and ethylene. *Plant Cell Env* 12: 433-439
- Vriezen WH, Zhou Z, Van Der Straeten D (2003) Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. *Ann Bot* 91: 263-270

- Walker GH, Huber SC (1987) Spinach leaf 6-phosphofructo-2-kinase. Isolation of a new enzyme form that undergoes ATP-dependent modification. *FEBS Lett* 213: 375-380
- Wample RL, Davis RW (1983) Effect of flooding on starch accumulation in chloroplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiol* 73: 195-198
- Wang F, Smith AG, Brenner ML (1994) Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit development. *Plant Physiol* 104: 535-540
- Waters I, Armstrong W, Thompson CJ, Setter TL, Adkins S, Gibbs J, Greenway H (1989) Diurnal changes in radial oxygen loss and ethanol metabolism in roots of submerged and nonsubmerged rice seedlings. *New Phytol* 113: 439-451
- Waters I, Morell S, Greenway H, Colmer D (1991) Effects of anoxia on wheat seedlings. II Influence of O₂ supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. *J Exp Bot* 42: 1437-1447
- Webb T, Armstrong W (1983) The effects of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. *J Exp Bot* 34: 579-603
- Weiner H, Stitt M, Heldt HW (1987) Subcellular compartmentalization of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 893: 13-21
- Wignarajah K, Greenway H (1976) Effect of anaerobiosis on activity of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in roots of *Zea mays*. *New Phytol* 77: 575-587
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 1517-1529
- Winter H, Huber JL, Huber SC (1997) Membrane association of sucrose synthase: changes during graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Lett* 420: 151-155
- Woitke P, Martin CD, Nicklisch S, Kohl JG (1994) HPLC determination of lipophilic photosynthetic pigments in algal cultures and lake water samples using a non-endcapped C18-RP-column. *Fresenius J Anal Chem* 348: 762-768
- Wong JH, Kang T, Buchanan BB (1988) A novel pyrophosphate D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from carrot roots. Relation to PFK from the same source. *FEBS Lett* 238: 405-410
- Wong JH, Kiss F, Wu M-X, Buchanan BB (1990) Pyrophosphate fructose-6-P 1-phosphotransferase from tomato fruit. Evidence for change during ripening. *Plant Physiol* 94: 499-506
- Wong JH, Yee BC, Buchanan BB (1987) A novel type of phosphofructokinase from plants. *J Biol Chem* 262: 3185-3191
- Wood SM, King SP, Kuzma MM, Blakeley SD, Newcomb W, Dennis DT (2002) Pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase overexpression in transgenic tobacco: physiological and biochemical analysis of source and sink tissues. *Can J Bot* 80: 983-992
- Wu MX, Smyth DA, Black CC (1983) Fructose 2,6-bisphosphate and the regulation of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase activity in germinating pea seeds. *Plant Physiol* 73: 188-191
- Wulff K, Döppen W (1985) ATP: luminometric method. In: Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 357-370
- Xia JH, Roberts JKM (1994) Improved cytoplasmic pH regulation increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment. *Plant Physiol* 105: 651-657

- Xia JH, Saglio PH (1992) Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. *Plant Physiol* 100: 40-46
- Yan TF, Tao M (1984) Multiple forms of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from wheat seedlings. Regulation by fructose 2,6-bisphosphate *J Biol Chem* 259: 5087-5092
- Yazaki J, Kishimoto N, Ishikawa M, Kikuchi S (2002) The rice expression database (RED): gateway to rice functional genomics. *Trends Plant Sci* 7: 563-564
- Yordanova RY, Alexieva VS, Popova LP (2003) Influence of root oxygen deficiency on photosynthesis and antioxidant status in barley plants. *Russian J Plant Physiol* 50: 163-167
- Yu Q, Rengel Z (1999) Waterlogging influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupin and transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol* 155: 431-438
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE (1998) Differential regulation of sugar sensitive sucrose synthase by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol* 116: 1573-1583
- Zhang J, Davies WJ (1987) Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *J Exp Bot* 38: 2015-2023
- Zhang M, Nagata S, Miyazawa K, Kikuchi H, Esashi Y (1997) A competitive Enzyme-linked immunosorbent assay to quantify acetaldehyde-protein adducts that accumulate in dry seeds during aging. *Plant Physiol* 113: 397-402
- Zhou D, Solomos T (1998) Effect of hypoxia on sugar accumulation, respiration, activities of amylase and starch phosphorylase, and induction of alternative oxidase and invertase during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Russet Burbank) at 1°C. *Physiol Plant* 104: 255-265
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632
- Zimmermann RC, Kohrs DG, Steller DL, Alberte RS (1995) Carbon partitioning in eelgrass. Regulation by photosynthesis and the response to daily light-dark cycles. *Plant Physiol* 108:1665-1671
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence for the crucial role of sucrose synthase for the sink strength using transgenic potato plants. *Plant J* 7: 97-107
- Zuckermann H, Harren FJM, Reuss J, Parker DH (1997) Dynamics of acetaldehyde production during anoxia and post-anoxia in red bell pepper studied by photoacoustic techniques. *Plant Physiol* 113: 925-932

Anhang

A) Protein- und Aminosäure-Sequenzen der Phosphofructokinasen

PFK1

1	ATG	TCA	TCT	TCT	GTT	CCA	AAC	TCG	GAC	CGG	AAG	ATT	GTT	ACT	GGT	45
1	M	S	S	S	V	P	N	S	D	R	K	I	V	T	G	15
46	CCC	GCC	GGT	TAT	ATT	CTT	GAA	GAC	GTT	CCT	CAT	TTC	TCC	GAC	GAC	90
16	P	A	G	Y	I	L	E	D	V	P	H	F	S	D	D	30
91	TTT	CCT	GAT	CAT	CCT	ACA	TAT	CCA	AAT	CCA	TTA	CAA	GAC	AAT	GCA	135
31	F	P	D	H	P	T	Y	P	N	P	L	Q	D	N	A	45
136	GCT	TAC	TCT	GTT	GTT	AAG	CAG	TAT	TTT	GTC	GAT	GAG	GAT	GAC	ACG	180
46	A	Y	S	V	V	K	Q	Y	F	V	D	E	D	D	T	60
181	GTT	CCT	CAA	AAA	ATA	GTA	GTT	CAT	CCT	GAT	AGT	CCT	AGG	GGA	ACG	225
61	V	P	Q	K	I	V	V	H	P	D	S	P	R	G	T	75
226	CAT	TTC	CGT	CGT	GCA	GGA	CCA	CGT	CAA	AGG	GTT	TAC	TTT	GAG	TCG	270
76	H	F	R	R	A	G	P	R	Q	R	V	Y	F	E	S	90
271	GAT	GAT	GTT	CTT	GCT	TGC	ATT	GTT	ACA	TGT	GGC	GGT	CTA	TGT	CCC	315
91	D	D	V	L	A	C	I	V	T	C	G	G	L	C	P	105
316	GGG	CTT	AAT	ACT	GTG	ATC	AGA	GAG	ATA	GTT	TGT	GGA	TTA	TCT	TAT	360
106	G	L	N	T	V	I	R	E	I	V	C	G	L	S	Y	120
361	ATG	TAT	GGT	GTC	AAG	AGA	ATC	CTT	GGC	ATT	GAT	GGA	GGT	TAC	AGA	405
121	M	Y	G	V	K	R	I	L	G	I	D	G	G	Y	R	135
406	GGA	TTT	TAC	GCG	AGA	AAC	ACA	ATC	CAT	TTG	GAC	TTA	AAA	ACA	GTG	450
136	G	F	Y	A	R	N	T	I	H	L	D	L	K	T	V	150
451	AAT	GAT	ATC	CAT	AGA	AGC	GGA	GGA	ACT	ATC	CTC	GGG	ACT	TCA	AGA	495
151	N	D	I	H	R	S	G	G	T	I	L	G	T	S	R	165
496	GGC	GGT	CAC	AAC	ACC	ACC	AAG	ATA	GTA	GAT	AGT	ATT	CAA	GAT	CGC	540
166	G	G	H	N	T	T	K	I	V	D	S	I	Q	D	R	180
541	GGG	ATT	AAC	CAG	GTT	TAT	ATA	ATC	GGT	GGA	GAT	GGA	TCA	CAG	AAA	585
181	G	I	N	Q	V	Y	I	I	G	G	D	G	S	Q	K	195
586	GGA	GCA	GCT	GCT	ATA	TTC	GAG	GAG	ATT	AGG	AAA	CGC	AAG	CTT	AAA	630
196	G	A	A	A	I	F	E	E	I	R	K	R	K	L	K	210
631	GTT	GCG	GTT	GCC	GGA	ATC	CCG	AAA	ACA	ATT	GAC	AAT	GAC	ATT	CCT	675
211	V	A	V	A	G	I	P	K	T	I	D	N	D	I	P	225
676	ATT	ATC	GAT	AGA	TCT	TTC	GGG	TTT	GAC	ACA	GCT	GTA	GAA	GAG	GCT	720
226	I	I	D	R	S	F	G	F	D	T	A	V	E	E	A	240
721	CAA	CGT	GCT	ATC	AAT	GCA	GCA	CAT	GTC	GAA	GCT	ACA	AGC	TTT	GAG	765
241	Q	R	A	I	N	A	A	H	V	E	A	T	S	F	E	255
766	AAT	GGT	ATT	GGT	CTT	GTG	AAG	TTA	ATG	GGA	CGG	TAC	AGC	GGA	TTC	810
256	N	G	I	G	L	V	K	L	M	G	R	Y	S	G	F	270
811	ATT	GCA	ATG	CAT	GCC	ACT	CTA	GCC	AGC	CGA	GAT	GTG	GAC	TGT	TGC	855
271	I	A	M	H	A	T	L	A	S	R	D	V	D	C	C	285
856	TTG	ATC	CCG	GAA	TCT	CCA	TTT	TTT	CTT	GAA	GGC	TCG	GGC	GGG	CTT	900
286	L	I	P	E	S	P	F	F	L	E	G	S	G	G	L	300
901	TTT	GAA	TTT	ATC	GAT	AAA	CGG	TTA	AAG	GAG	AGT	GGT	CAT	ATG	GTG	945
301	F	E	F	I	D	K	R	L	K	E	S	G	H	M	V	315
946	ATT	GTA	ATT	GCA	GAA	GGT	GCG	GGA	CAA	GAT	CTG	TTG	TCT	GAA	AGC	990
316	I	V	I	A	E	G	A	G	Q	D	L	L	S	E	S	330
991	ATG	AAA	GAG	TCC	ACA	ACT	CTC	AAA	GAT	GCC	TCT	GGA	AAC	AAA	CTT	1035
331	M	K	E	S	T	T	L	K	D	A	S	G	N	K	L	345

1036	CTT	CAA	GAC	ATT	GGC	CTA	TGG	ATC	TCC	CAA	AGA	ATC	AAG	GAT	CAT	1080
346	L	Q	D	I	G	L	W	I	S	Q	R	I	K	D	H	360
1081	TTT	GCC	AAG	AAG	ATG	ACC	CTT	ACC	CTC	AAA	TAT	ATA	GAT	CCA	ACC	1125
361	F	A	K	K	M	T	L	T	L	K	Y	I	D	P	T	375
1126	TAC	ATG	ATA	CGA	GCT	GTT	CCG	AGC	AAT	GCA	TCA	GAC	AAT	GTA	TGC	1170
376	Y	M	I	R	A	V	P	S	N	A	S	D	N	V	C	390
1171	TGC	ACG	CTT	TTA	GCT	CAA	AGC	GCG	GTT	CAT	GGA	GTG	ATG	GCT	GGT	1215
391	C	T	L	L	A	Q	S	A	V	H	G	V	M	A	G	405
1216	TAC	AAT	GGT	TTC	ACT	GTT	GGC	CTT	GTC	AAT	GGA	AGA	CAT	ACT	TAC	1260
406	Y	N	G	F	T	V	G	L	V	N	G	R	H	T	Y	420
1261	ATT	CCC	TTC	AAT	AGG	ATC	ACG	GAG	AAA	CAG	AAC	AAG	GTG	GTG	ATC	1305
421	I	P	F	N	R	I	T	E	K	Q	N	K	V	V	I	435
1306	ACT	GAC	AGA	ATG	TGG	GCG	AGG	CTT	TTG	TCT	TCG	ACG	AAC	CAA	CCG	1350
436	T	D	R	M	W	A	R	L	L	S	S	T	N	Q	P	450
1351	AGT	TTC	ATG	AAG	CAA	GCT	GAC	AAG	ATC	CAC	TCA	AAC	CAG	TTG	GTT	1395
451	S	F	M	K	Q	A	D	K	I	H	S	N	Q	L	V	465
1396	GGT	GAA	CCA	GGG	ACC	ATG	AAA	TGG	TGA							1422
466	G	E	P	G	T	M	K	W	*							

PFK2

1	ATG	GCC	GCC	GAA	ACT	AGC	ATC	AGG	AAG	CTC	CCA	TCT	CTC	TCC	GGC	45
1	M	A	A	E	T	S	I	R	K	L	P	S	L	S	G	15
46	CTC	CGT	CAC	CGA	CGT	AAT	CCA	CTG	GAA	GAT	AAT	CCC	TAC	TTC	CAC	90
16	L	R	H	R	R	N	P	L	E	D	N	P	Y	F	H	30
91	CCC	TCC	AAT	GGC	TTC	TAC	ATC	ACT	CCT	TCT	GAC	GTC	ATC	CTC	GCC	135
31	P	S	N	G	F	Y	I	T	P	S	D	V	I	L	A	45
136	CAG	GTC	GCC	TAC	GAC	CAC	TCC	GCC	C AC	TCC	CAA	TCA	CGC	GTG	GCC	180 ¹
46	Q	V	A	Y	D	H	S	A	H	S	Q	S	R	V	A	60
181	TAC	CAC	AGG	GCT	GGG	CCT	CGC	CGT	GAG	ATC	ATG	TAC	GAG	CCA	TCA	225
61	Y	H	R	A	G	P	R	R	E	I	M	Y	E	P	S	75
226	GCT	GTC	AAG	GCG	GCG	ATC	GTT	ACG	TGC	GGT	GGG	CTG	TGC	CCT	GGC	270
76	A	V	K	A	A	I	V	T	C	G	G	L	C	P	G	90
271	ATG	AAC	ACA	GTC	ATA	AGA	GAA	CTC	GTG	GTG	GGT	CTT	TGG	GAG	CTG	315
91	M	N	T	V	I	R	E	L	V	V	G	L	W	E	L	105
316	TAC	GGT	GTG	AGA	GAG	ATA	TAT	GGG	ATA	CCA	GCT	GGT	TAC	AGA	GGC	360
106	Y	G	V	R	E	I	Y	G	I	P	A	G	Y	R	G	120
361	TTT	TAT	TCC	ATG	AAA	GCC	GTC	AAG	TTA	GAT	CCC	AAG	GCG	GTT	CAT	405
121	F	Y	S	M	K	A	V	K	L	D	P	K	A	V	H	135
406	GAT	TGG	CAC	AAG	AAG	GGT	GGC	ACT	GTC	CTC	GCC	ACT	TCT	CGA	GGT	450
136	D	W	H	K	K	G	G	T	V	L	A	T	S	R	G	150
451	GGC	TTC	CAT	CTC	CAA	AAG	ATC	GTC	GAT	GCC	ATT	CAT	CTC	AAC	GGT	495
151	G	F	H	L	Q	K	I	V	D	A	I	H	L	N	G	165
496	TAT	AAC	CAG	GTG	TAT	ATA	ATA	GGA	GGA	GAC	GGC	ACA	ATG	CGT	GGG	540
166	Y	N	Q	V	Y	I	I	G	G	D	G	T	M	R	G	180
541	GCT	GTT	GAG	ATC	TTC	AAG	GAA	ATC	AGC	CTC	AGG	AAA	CTG	GAG	GTG	585
181	A	V	E	I	F	K	E	I	S	L	R	K	L	E	V	195
586	GGA	ATC	ACG	GTT	ATT	CCC	AAA	ACC	GTA	GAC	AAC	GAT	GTC	GGC	ATC	630
196	G	I	T	V	I	P	K	T	V	D	N	D	V	G	I	210

¹ großer Buchstabe: fehlende Base in der klonierten Sequenz, führt zum frühzeitigen Stop-Codon

631	ATT	GAT	AGA	TCA	TTT	GGC	TTT	CAA	ACG	GCT	GTA	GAG	ATG	GCT	CAG	675
211	I	D	R	S	F	G	F	Q	T	A	V	E	M	A	Q	225
676	GAG	GCT	ATA	TCT	GCT	GCT	CAC	GTG	GAG	GCC	GAG	AGT	GCA	GTC	AAT	720
226	E	A	I	S	A	A	H	V	E	A	E	S	A	V	N	240
721	GGC	ATT	GGA	CTT	GTG	AAG	CTT	ATG	GGC	AGA	AGT	ACT	GGT	CAC	ATT	765
241	G	I	G	L	V	K	L	M	G	R	S	T	G	H	I	255
766	GCT	CTA	CAT	GCC	ACT	CTT	AGC	AGC	CGT	GAT	GTG	GAC	TGT	TGT	TTG	810
256	A	L	H	A	T	L	S	S	R	D	V	D	C	C	L	270
811	ATC	CCT	GAG	ATG	GAC	TTC	TAC	CTT	GAA	GGC	AAA	GGT	GGG	CTC	TTT	855
271	I	P	E	M	D	F	Y	L	E	G	K	G	G	L	F	285
856	GAG	TTT	TTG	GAG	AAG	AGA	CTA	AAA	GAA	CGT	GGG	CAT	GCT	GTT	CTT	900
286	E	F	L	E	K	R	L	K	E	R	G	H	A	V	L	300
901	GTT	GTG	GCT	GAA	GGG	GCA	GGT	CAA	GAG	ATG	ATC	CCA	AGA	AAT	GAA	945
301	V	V	A	E	G	A	G	Q	E	M	I	P	R	N	E	315
946	TCA	CAG	AAA	CAA	GAG	AGG	GAT	GAA	TCT	GGC	AAC	GCA	GTT	TTC	TTG	990
316	S	Q	K	Q	E	R	D	E	S	G	N	A	V	F	L	330
991	GAT	GTG	GGA	GTC	TGG	TTT	AAG	TCC	GTG	CTC	AAG	GCC	TGG	TGG	GAG	1035
331	D	V	G	V	W	F	K	S	V	L	K	A	W	W	E	345
1036	CGA	GAG	CAT	CCA	GAC	GAG	CTC	TTC	ACT	GTC	AAG	TAT	ATC	GAT	CCG	1080
346	R	E	H	P	D	E	L	F	T	V	K	Y	I	D	P	360
1081	ACT	TAC	ATG	ATA	AGA	GCT	GTA	CCT	GCA	AAT	GCT	ACG	GAT	AAC	TTG	1125
361	T	Y	M	I	R	A	V	P	A	N	A	T	D	N	L	375
1126	TAT	TGT	ACA	CTC	TTG	GCC	CAC	TCG	GCT	ATC	CAT	GGA	GTC	ATG	GCT	1170
376	Y	C	T	L	L	A	H	S	A	I	H	G	V	M	A	390
1171	GGT	TAC	ACA	GGG	TTC	GTC	CCT	GGC	CCG	ATC	AAT	GGG	AAC	TAT	GCT	1215
391	G	Y	T	G	F	V	P	G	P	I	N	G	N	Y	A	405
1216	TAT	ATC	CCC	TTA	GAG	GAG	GTG	GCA	CAG	ACT	AAG	AAC	CAA	GTA	AAC	1260
406	Y	I	P	L	E	E	V	A	Q	T	K	N	Q	V	N	420
1261	ACG	CGT	GAC	CAC	AAG	TGG	GCC	TGG	GTG	CGC	TCA	GTC	ACA	AAC	CAG	1305
421	T	R	D	H	K	W	A	W	V	R	S	V	T	N	Q	435
1306	CCT	GAT	TTT	GAA	ACG	AAC	GTT	AAG	GGT	TAA	1335					
436	P	D	F	E	T	N	V	K	G	*						

PFK3

1	ATG	AGT	ACT	GTG	GAG	AGT	AGC	AAA	CCG	AAG	ATC	ATC	AAT	GGC	TCT	45
1	M	S	T	V	E	S	S	K	P	K	I	I	N	G	S	15
46	TGT	GGT	TAT	GTT	CTA	GAA	GAT	GTA	CCG	CAT	CTC	TCC	GAT	TAC	CTT	90
16	C	G	Y	V	L	E	D	V	P	H	L	S	D	Y	L	30
91	CCT	GGT	CTT	CCT	ACT	TAT	CCT	AAT	CCA	TTG	CAA	GAC	AAT	CCA	GCT	135
31	P	G	L	P	T	Y	P	N	P	L	Q	D	N	P	A	45
136	TAC	TCA	GTG	GTT	AAG	CAA	TAC	TTT	GTT	GAT	GCT	GAT	GAC	AGT	GTT	180
46	Y	S	V	V	K	Q	Y	F	V	D	A	D	D	S	V	60
181	TCT	CAA	AAG	ATC	GTT	GTT	CAC	AAG	GAT	GGT	CCA	AGG	GGG	ATT	CAT	225
61	S	Q	K	I	V	V	H	K	D	G	P	R	G	I	H	75
226	TTT	AGA	CGA	GCC	GGG	CCA	CGT	CAG	AAG	GTA	TAC	TTC	GAA	TCT	GAT	270
76	F	R	R	A	G	P	R	Q	K	V	Y	F	E	S	D	90
271	GAA	GTG	CAT	GCT	TGC	ATA	GTT	ACC	TGT	GGA	GGT	CTT	TGT	CCT	GGC	315
91	E	V	H	A	C	I	V	T	C	G	G	L	C	P	G	105
316	CTT	AAT	ACC	GTG	ATT	AGA	GAA	ATA	GTG	AGC	AGT	CTA	TCT	TAT	ATG	360
106	L	N	T	V	I	R	E	I	V	S	S	L	S	Y	M	120
361	TAT	GGA	GTG	AAG	AGA	ATA	CTG	GGA	ATA	GAT	GGC	GGA	TAT	AGA	GGC	405
121	Y	G	V	K	R	I	L	G	I	D	G	G	Y	R	G	135

406	TTT	TAT	GCT	AAG	AAT	ACT	GTC	TCC	TTG	GAC	TCT	AAA	GTT	GTA	AAT	450
136	F	Y	A	K	N	T	V	S	L	D	S	K	V	V	N	150
451	GAT	ATC	CAT	AAG	CGT	GGA	GGG	ACT	ATC	CTT	GGG	ACC	TCA	CGA	GGT	495
151	D	I	H	K	R	G	G	T	I	L	G	T	S	R	G	165
496	GGT	CAC	GAT	ACC	ACA	AAG	ATA	GTT	GAC	AGC	ATT	CAA	GAT	CGA	GGA	540
166	G	H	D	T	T	K	I	V	D	S	I	Q	D	R	G	180
541	ATC	AAT	CAG	GTT	TAC	ATT	ATA	GGA	GGA	GAT	GGA	ACA	CAG	CGA	GGA	585
181	I	N	Q	V	Y	I	I	G	G	D	G	T	Q	R	G	195
586	GCA	TCT	GTC	ATA	TTT	GAG	GAA	ATT	AGA	AGA	CGT	GGC	CTG	AAA	GTT	630
196	A	S	V	I	F	E	E	I	R	R	R	G	L	K	V	210
631	GCA	GTT	ATT	GGA	ATC	CCG	AAA	ACA	ATC	GAT	AAT	GAC	ATA	CCT	GTG	675
211	A	V	I	G	I	P	K	T	I	D	N	D	I	P	V	225
676	ATA	GAC	AAA	TCT	TTT	GGG	TTT	GAC	ACT	GCT	GTA	GAA	GAG	GCT	CAA	720
226	I	D	K	S	F	G	F	D	T	A	V	E	E	A	Q	240
721	CGA	GCT	ATT	AAT	GCA	GCA	CAT	GTG	GAA	GCC	GAG	AGT	ATA	GAG	AAT	765
241	R	A	I	N	A	A	H	V	E	A	E	S	I	E	N	255
766	GGT	ATC	GGA	GTT	GTC	AAG	CTT	ATG	GGT	CGC	TAC	AGT	GGG	TTC	ATA	810
256	G	I	G	V	V	K	L	M	G	R	Y	S	G	F	I	270
811	GCG	ATG	TAT	GCC	ACT	CTA	GCA	AGC	AGA	GAT	GTG	GAC	TGC	TGT	TTG	855
271	A	M	Y	A	T	L	A	S	R	D	V	D	C	C	L	285
856	ATT	CCG	GAG	TCA	CCA	TTT	TAC	CTG	GAA	GGA	GAA	GGC	GGA	CTG	TTT	900
286	I	P	E	S	P	F	Y	L	E	G	E	G	G	L	F	300
901	GAG	TAC	ATA	GAG	AAA	CGA	CTC	AAG	GAG	AGC	GGT	CAC	ATG	GTT	CTT	945
301	E	Y	I	E	K	R	L	K	E	S	G	H	M	V	L	315
946	GTG	ATT	GCA	GAA	GGT	GCA	GGA	CAA	GAT	CTA	ATG	TCG	AAG	AGC	ATG	990
316	V	I	A	E	G	A	G	Q	D	L	M	S	K	S	M	330
991	GAA	TCT	ATG	ACA	CTC	AAA	GAT	GCA	TCT	GGT	AAC	AAA	CTT	CTT	AAA	1035
331	E	S	M	T	L	K	D	A	S	G	N	K	L	L	K	345
1036	GAT	GTT	GGC	CTT	TGG	CTG	TCA	CAA	AGC	ATC	AAG	GAT	CAT	TTT	AAT	1080
346	D	V	G	L	W	L	S	Q	S	I	K	D	H	F	N	360
1081	CAG	AAG	AAG	ATG	GTG	ATG	AAC	CTC	AAG	TAC	ATA	GAT	CCA	ACA	TAC	1125
361	Q	K	K	M	V	M	N	L	K	Y	I	D	P	T	Y	375
1126	ATG	ATT	CGA	GCT	GTT	CCT	AGC	AAT	GCG	TCA	GAC	AAT	GTT	TAT	TGT	1170
376	M	I	R	A	V	P	S	N	A	S	D	N	V	Y	C	390
1171	ACA	CTT	CTG	GCT	CAG	AGT	GCA	GTG	CAC	GGT	GCA	ATG	GCT	GGA	TAC	1215
391	T	L	L	A	Q	S	A	V	H	G	A	M	A	G	Y	405
1216	ACT	GGC	TAT	ATC	AGT	GGT	CTA	GTG	AAC	GGA	AGA	CAA	ACC	TAC	ATA	1260
406	T	G	Y	I	S	G	L	V	N	G	R	Q	T	Y	I	420
1261	CCC	TTT	TAC	AGG	ATA	ACG	GAG	AAA	CAG	AAC	CAT	GTG	GTG	ATC	ACA	1305
421	P	F	Y	R	I	T	E	K	Q	N	H	V	V	I	T	435
1306	GAC	AGG	ATG	TGG	GCA	AGG	CTA	CTC	TCT	TCG	ACA	AAC	CAG	CCG	AGT	1350
436	D	R	M	W	A	R	L	L	S	S	T	N	Q	P	S	450
1351	TTC	TTG	GGC	CCC	AAA	GAT	GTC	TTT	GAT	AAT	AAA	GAG	AAA	CCG	ATG	1395
451	F	L	G	P	K	D	V	F	D	N	K	E	K	P	M	465
1396	TCG	GCT	CTC	CTT	GAC	GAT	GGT	AAC	TGC	AAT	GGC	GTG	GTG	GAT	GTT	1440
466	S	A	L	L	D	D	G	N	C	N	G	V	V	D	V	480
1441	CCT	CCA	GTC	ACC	AAA	GAG	ATC	ACC	AAG	TGA	1470					
481	P	P	V	T	K	E	I	T	K	*						

PFK4

1	ATG	GAA	GCT	TCG	ATT	TCG	TTT	CTG	GGG	TCA	ACA	AAA	CCC	AAT	ATT	45
1	M	E	A	S	I	S	F	L	G	S	T	K	P	N	I	15
46	TCC	TTG	TTT	AAC	CCT	TCT	TCA	AAC	GTC	CTT	CCT	CGT	AGA	GAT	TTC	90
16	S	L	F	N	P	S	S	N	V	L	P	R	R	D	F	30
91	CCT	TTT	CCT	GCT	TTG	AAA	TTG	AAG	AAA	GTT	TCA	GTG	CTG	CCT	CGA	135
31	P	F	P	A	L	K	L	K	K	V	S	V	L	P	R	45
136	ATC	TTG	CAC	CAG	AAA	CGA	CTC	ATC	AGA	GCT	CAG	TGC	TCT	GAT	GGA	180
46	I	L	H	Q	K	R	L	I	R	A	Q	C	S	D	G	60
181	TTC	AAA	CCA	GAG	GAA	GAC	GAT	GGG	TTT	GTC	CTA	GAA	GAC	GTT	CCT	225
61	F	K	P	E	E	D	D	G	F	V	L	E	D	V	P	75
226	CAC	TTG	ACC	AAA	TTT	CTC	CCT	GAT	TTA	CCG	TCA	TAT	CCA	AAT	CCA	270
76	H	L	T	K	F	L	P	D	L	P	S	Y	P	N	P	90
271	TTG	AAA	GAA	AGC	CAA	GCA	TAT	GCC	ATT	GTT	AAG	CGA	ACT	TTT	GTC	315
91	L	K	E	S	Q	A	Y	A	I	V	K	R	T	F	V	105
316	AGT	TCC	GAA	GAT	GTG	GTT	GCG	CAA	AAT	ATT	GTA	GTC	CAG	AAG	GGA	360
106	S	S	E	D	V	V	A	Q	N	I	V	V	Q	K	G	120
361	AGT	AAG	CGA	GGA	GTA	CAC	TTT	AGG	CGA	GCA	GGG	CCT	CGA	GAA	AGA	405
121	S	K	R	G	V	H	F	R	R	A	G	P	R	E	R	135
406	GTG	TAC	TTC	AGA	TCA	GAT	GAA	GTA	AAA	GCT	TGC	ATA	GTG	ACT	TGT	450
136	V	Y	F	R	S	D	E	V	K	A	C	I	V	T	C	150
451	GGG	GGC	TTG	TGC	CCT	GGA	ATC	AAT	ACT	GTT	ATA	CGG	GAA	ATT	GTA	495
151	G	G	L	C	P	G	I	N	T	V	I	R	E	I	V	165
496	TGT	GGA	TTG	AAC	AAT	ATG	TAT	GGT	GTT	AAT	AAC	ATT	CTC	GGC	ATT	540
166	C	G	L	N	N	M	Y	G	V	N	N	I	L	G	I	180
541	CAG	GGA	GGA	TAT	AGA	GGC	TTT	TAC	TCC	AAA	AAC	ACT	ATG	AAC	CTG	585
181	Q	G	G	Y	R	G	F	Y	S	K	N	T	M	N	L	195
586	ACA	CCT	AAA	GTA	GTT	AAC	GAT	ATT	CAT	AAA	CGC	GGT	GGC	ACT	TTT	630
196	T	P	K	V	V	N	D	I	H	K	R	G	G	T	F	210
631	CTT	CAA	ACC	TCA	AGA	GGA	GGA	CAT	GAT	ACA	GCG	AAG	ATT	GTT	GAT	675
211	L	Q	T	S	R	G	G	H	D	T	A	K	I	V	D	225
676	AAT	ATT	CAA	GAT	AGA	GGA	ATA	AAT	CAG	GTA	TAT	ATT	ATT	GGA	GGT	720
226	N	I	Q	D	R	G	I	N	Q	V	Y	I	I	G	G	240
721	GGT	GGG	ACG	CAA	AAG	GGT	GCA	GAG	AAG	ATA	TAC	GAG	GAA	GTT	GAG	765
241	G	G	T	Q	K	G	A	E	K	I	Y	E	E	V	E	255
766	AGG	CGT	GGT	CTT	CAA	GTG	GCG	GTT	TCT	GGC	ATT	CCT	AAG	ACA	ATT	810
256	R	R	G	L	Q	V	A	V	S	G	I	P	K	T	I	270
811	GAT	AAT	GAT	ATT	GCT	GTG	ATT	GAC	AAA	TCA	TTT	GGC	TTT	GAT	ACG	855
271	D	N	D	I	A	V	I	D	K	S	F	G	F	D	T	285
856	GCG	GTT	GAG	GAA	GCA	CAA	CGA	GCT	ATT	AAT	GCT	GCA	CAT	GTA	GAG	900
286	A	V	E	E	A	Q	R	A	I	N	A	A	H	V	E	300
901	GTC	GAG	AGC	GTG	GAA	AAT	GGA	GTT	GGT	ATC	GTT	AAA	CTC	ATG	GGC	945
301	V	E	S	V	E	N	G	V	G	I	V	K	L	M	G	315
946	AGA	TAC	AGT	GGT	TTT	ATT	GCC	ATG	ATT	GCA	ACT	TTA	GCG	AAT	CGT	990
316	R	Y	S	G	F	I	A	M	I	A	T	L	A	N	R	330
991	GAT	GTG	GAT	TGT	TGC	TTG	ATT	CCA	GAG	TCT	CCA	TTT	TTT	CTT	GAA	1035
331	D	V	D	C	C	L	I	P	E	S	P	F	F	L	E	345
1036	GGA	AAG	GGT	GGG	CTC	TTT	GAG	TTT	ATT	GAA	GAA	CGA	CTC	AAA	GAG	1080
346	G	K	G	G	L	F	E	F	I	E	E	R	L	K	E	360
1081	AAT	AGG	CAC	ATG	GTT	ATT	GTG	ATA	GCT	GAA	GGA	GCT	GGA	CAG	GAT	1125
361	N	R	H	M	V	I	V	I	A	E	G	A	G	Q	D	375

1126	TAT	GTT	GCT	CAA	AGC	ATG	CGT	GCA	TCT	GAA	ACT	AAA	GAC	GCC	TCA	1170
376	Y	V	A	Q	S	M	R	A	S	E	T	K	D	A	S	390
1171	GGA	AAT	AGA	CTC	TTG	CTT	GAT	GTT	GGT	CTA	TGG	TTG	ACT	CAA	CAG	1215
391	G	N	R	L	L	L	D	V	G	L	W	L	T	Q	Q	405
1216	ATA	AAG	GAT	CAC	TTT	ACA	AAT	GTT	CGG	AAA	ATG	ATG	ATA	AAT	ATG	1260
406	I	K	D	H	F	T	N	V	R	K	M	M	I	N	M	420
1261	AAG	TAC	ATA	GAC	CCA	ACG	TAT	ATG	ATA	AGA	GCA	ATA	CCG	AGT	AAC	1305
421	K	Y	I	D	P	T	Y	M	I	R	A	I	P	S	N	435
1306	GCA	TCA	GAC	AAT	GTC	TAT	TGC	ACT	CTT	CTT	GCC	CAA	AGT	GCA	GTT	1350
436	A	S	D	N	V	Y	C	T	L	L	A	Q	S	A	V	450
1351	CAT	GGA	GCA	ATG	GCT	GGG	TAC	TCA	GGT	TTC	ACT	GTA	GGA	CCA	GTT	1395
451	H	G	A	M	A	G	Y	S	G	F	T	V	G	P	V	465
1396	AAC	AGT	AGA	CAT	GCT	TAC	ATC	CCA	ATT	TCT	CAG	GTG	ACG	GAA	GTG	1440
466	N	S	R	H	A	Y	I	P	I	S	Q	V	T	E	V	480
1441	ACA	AAT	ACG	GTG	AAG	CTA	ACT	GAT	AGG	ATG	TGG	GCT	AGA	CTC	CTT	1485
481	T	N	T	V	K	L	T	D	R	M	W	A	R	L	L	495
1486	GCA	TCG	ACA	AAT	CAA	CCG	AGT	TTC	TTG	ACT	GGT	GAA	GGA	GCA	TTG	1530
496	A	S	T	N	Q	P	S	F	L	T	G	E	G	A	L	510
1531	CAG	AAT	GTG	ATC	GAC	ATG	GAA	ACT	CAA	GAA	AAG	ATC	GAT	AAC	ATG	1575
511	Q	N	V	I	D	M	E	T	Q	E	K	I	D	N	M	525
1576	AAG	ATC	TCT	TCT	ATC	TAA										1593
526	K	I	S	S	I	*										

PFK5

1	ATG	GAT	GCT	CTT	TCT	CAG	GCG	ATC	AGT	TCC	GGG	ATC	TCC	GTT	CCT	45	¹
1	M	D	A	L	S	Q	A	I	S	S	G	I	S	V	P	15	
46	TAC	AAG	AAC	AAT	TCT	TCT	TCT	CTC	GTT	CCT	TCT	CAC	GGA	CTC	ACC	90	
16	Y	K	N	N	S	S	S	L	V	P	S	H	G	L	T	30	
91	TCC	TTA	ATC	CTC	CGG	AAA	TCG	AGA	TCT	CCG	GTG	AAT	CCC	TCA	TCA	135	
31	S	L	I	L	R	K	S	R	S	P	V	N	P	S	S	45	
136	CGA	TCT	CGC	GTC	TCG	GTG	CGA	GCT	TCG	GAG	ATT	CAA	CAC	AGC	AAA	180	
46	R	S	R	V	S	V	R	A	S	E	I	Q	H	S	K	60	
181	ACC	TCA	GCT	TCA	TCG	ATC	GAT	CTC	AGC	GAT	CCA	GAT	TGG	AAA	TTA	225	
61	T	S	A	S	S	I	D	L	S	D	P	D	W	K	L	75	
226	AAG	TAT	GAG	AAA	GAT	TTC	GAG	CAA	CGA	TTC	AGC	ATA	CCT	CAC	ATC	270	
76	K	Y	E	K	D	F	E	Q	R	F	S	I	P	H	I	90	
271	ACT	GAT	GTC	TTA	CCT	GAT	GCT	GAA	GCC	ATT	CGT	TCA	ACG	TTT	TGT	315	
91	T	D	V	L	P	D	A	E	A	I	R	S	T	F	C	105	
316	CTT	AAG	ATG	AGG	TCT	CCG	ACG	GAA	GAT	TTT	GTT	GGT	GGT	TAC	CCT	360	
106	L	K	M	R	S	P	T	E	D	F	V	G	G	Y	P	120	
361	TCT	GAT	GAA	GAA	TGG	CAT	GGA	TAC	ATT	AAT	AAC	AAT	GAT	AGA	GTT	405	
121	S	D	E	E	W	H	G	Y	I	N	N	N	D	R	V	135	
406	CTT	CTC	AAG	GTT	ATT	AGT	TAC	TCC	TCA	CCT	ACT	TCT	GCT	GGA	GCT	450	
136	L	L	K	V	I	S	Y	S	S	P	T	S	A	G	A	150	
451	GAG	TGC	CTT	GAT	CAT	GAC	TGT	TCT	TGG	GTT	GAA	CAA	TGG	ATT	CAC	495	
151	E	C	L	D	H	D	C	S	W	V	E	Q	W	I	H	165	
496	CGT	GCT	GGT	CCG	AGG	GAG	AAG	ATA	TAC	TTC	AGG	CCG	GAA	GAA	GTG	540	
166	R	A	G	P	R	E	K	I	Y	F	R	P	E	E	V	180	

¹ großer Buchstabe: fehlende Base in der klonierten Sequenz, führt zum frühzeitigen Stop-Codon

541	AAA	GCT	GCG	ATT	ATC	ACT	TGT	GGT	GGC	CTT	TGC	CCT	GGT	CTC	AAT	585
181	K	A	A	I	I	T	C	G	G	L	C	P	G	L	N	195
586	GAT	GTC	ATC	AGA	CAT	ATT	GTC	ATT	ACT	CTT	GAG	ATT	TAT	GGT	GTT	630
196	D	V	I	R	H	I	V	I	T	L	E	I	Y	G	V	210
631	AAG	AAC	ATT	GTG	GGG	ATT	CCT	TTC	GGT	TAT	CGA	GGC	TTC	TCT	GAT	675
211	K	N	I	V	G	I	P	F	G	Y	R	G	F	S	D	225
676	AAA	GAT	CTA	ACT	GAA	ATG	CCG	TTA	TCA	AGG	AAA	GTG	GTT	CAG	AAT	720
226	K	D	L	T	E	M	P	L	S	R	K	V	V	Q	N	240
721	ATT	CAT	TTA	TCT	GGA	GGA	AGT	TTG	CTT	GGA	GTT	TCA	CGT	GGA	GGC	765
241	I	H	L	S	G	G	S	L	L	G	V	S	R	G	G	255
766	CCG	AGT	GTG	AGT	GAA	ATT	GTC	GAC	AGC	ATG	GAG	GAG	AGA	GGA	ATC	810
256	P	S	V	S	E	I	V	D	S	M	E	E	R	G	I	270
811	AAC	ATG	CTT	TTC	GTG	CTC	GGT	GGA	AAC	GGA	ACT	CAT	GCT	GGC	GCC	855
271	N	M	L	F	V	L	G	G	N	G	T	H	A	G	A	285
856	AAC	GCT	ATA	CAC	AAT	GAG	TGC	CGC	AAA	AGA	AAG	ATA	AAG	GTA	GCT	900
286	N	A	I	H	N	E	C	R	K	R	K	I	K	V	A	300
901	GTA	GTT	GGT	GTG	CCA	AAA	ACC	ATC	GAC	AAT	GAT	ATT	TTA	CAT	ATG	945
301	V	V	G	V	P	K	T	I	D	N	D	I	L	H	M	315
946	GAT	AAA	ACT	TTT	GGG	TTT	GAT	ACT	GCT	GTT	GAA	GAA	GCT	CAA	CGA	990
316	D	K	T	F	G	F	D	T	A	V	E	E	A	Q	R	330
991	GCA	ATT	AAC	TCT	GCT	TAC	ATT	GAG	GCA	CAT	AGT	GCT	TAT	CAT	GGC	1035
331	A	I	N	S	A	Y	I	E	A	H	S	A	Y	H	G	345
1036	ATT	GGC	GTT	GTA	AAA	CTG	ATG	GGT	CGT	AAC	AGT	GGT	TTC	ATT	GCT	1080
346	I	G	V	V	K	L	M	G	R	N	S	G	F	I	A	360
1081	ATG	CAA	GCC	TCT	CTA	GCA	AGT	GGA	CAA	GAC	GAC	ATC	TGT	TTG	ATT	1125
361	M	Q	A	S	L	A	S	G	Q	D	D	I	C	L	I	375
1126	CCT	GAG	GTT	CCC	TTC	AAT	CTT	CAT	GGG	CCT	AAT	GGT	GTA	TTG	AAG	1170
376	P	E	V	P	F	N	L	H	G	P	N	G	V	L	K	390
1171	CAT	TTG	AAG	TAC	CTT	ATT	GAA	ACA	AAA	GGC	TCT	GCT	GTG	ATC	TGT	1215
391	H	L	K	Y	L	I	E	T	K	G	S	A	V	I	C	405
1216	GTA	GCA	GAA	GGA	GCT	GGA	CAG	AAT	TTT	CTT	GAG	AAA	ACC	AAT	GCC	1260
406	V	A	E	G	A	G	Q	N	F	L	E	K	T	N	A	420
1261	AAA	GAT	GCA	TCT	GGA	AAC	GCC	GTA	CTT	GGT	GAT	TTC	GGT	GTG	TAT	1305
421	K	D	A	S	G	N	A	V	L	G	D	F	G	V	Y	435
1306	ATT	CAA	CAA	GAG	ACT	AAG	AAG	TAT	TTC	AAA	GAA	ATA	AGT	ACT	CCA	1350
436	I	Q	Q	E	T	K	K	Y	F	K	E	I	S	T	P	450
1351	ATA	GAT	GTG	AAG	TAT	ATT	GAT	CCA	ACA	TAC	ATG	ATT	CGC	GCT	GTA	1395
451	I	D	V	K	Y	I	D	P	T	Y	M	I	R	A	V	465
1396	CGT	GCA	AAT	GCC	TCG	GAT	GGT	ATC	CTC	TGC	ACC	GTT	CTT	GGA	CAA	1440
466	R	A	N	A	S	D	G	I	L	C	T	V	L	G	Q	480
1441	AAC	GCT	GTT	CAT	GGT	GCG	TTT	GCT	GGA	TAC	AGT	GGA	ATC	ACG	GTA	1485
481	N	A	V	H	G	A	F	A	G	Y	S	G	I	T	V	495
1486	GGC	ATA	ATC	AAC	ACT	CAC	TAT	GCA	TAT	TTG	CCA	ATC	ACT	GAG	GTA	1530
496	G	I	I	N	T	H	Y	A	Y	L	P	I	T	E	V	510
1531	ATT	GCA	TAT	CCA	AAA	TCA	GTG	GAT	CCT	AAT	AGT	CGA	ATG	TGG	CAT	1575
511	I	A	Y	P	K	S	V	D	P	N	S	R	M	W	H	525
1576	CGT	TGC	TTG	ACA	TCA	ACG	GGC	GAA	CCC	GAT	TTC	ATC	TAA	1614		
526	R	C	L	T	S	T	G	E	P	D	F	I	*			

PFK6

1	ATG	GCT	TCT	AAT	GGC	GTG	GAC	GAG	CAG	ATT	AAG	TTG	GTG	GAA	GGA	45
1	M	A	S	N	G	V	D	E	Q	I	K	L	V	E	G	15
46	CCT	GCT	GGT	TAT	GTA	CTC	GAA	GAT	GTT	CCT	CAT	TTG	AGC	GAT	TAC	90
16	P	A	G	Y	V	L	E	D	V	P	H	L	S	D	Y	30
91	ATT	CTC	GAT	CTC	CCC	ACT	TAT	CCA	AAC	CCG	TTG	CAA	TCA	AAT	GCT	135
31	I	L	D	L	P	T	Y	P	N	P	L	Q	S	N	A	45
136	GCA	TAT	TCA	GTA	GTA	AGG	CAG	TAT	TTT	GTT	GAT	GAG	GAT	GAT	ACA	180
46	A	Y	S	V	V	R	Q	Y	F	V	D	E	D	D	T	60
181	GTC	CAG	GAA	AAG	ATT	GTT	GTT	CAC	AAG	GAT	TCT	CCT	AGA	GGG	ACA	225
61	V	Q	E	K	I	V	V	H	K	D	S	P	R	G	T	75
226	CAT	TTT	AGA	CGT	GCA	GGC	CCG	CGC	CAA	AAG	GTG	TAC	TTC	AAG	CCA	270
76	H	F	R	R	A	G	P	R	Q	K	V	Y	F	K	P	90
271	TCT	GAT	GTG	CGT	GCC	TGT	ATT	GTC	ACT	TGT	GGT	GGC	CTA	TGC	CCC	315
91	S	D	V	R	A	C	I	V	T	C	G	G	L	C	P	105
316	GGG	CTT	AAT	ACA	GTT	ATC	AGG	GAG	ATC	GTG	TGT	GGT	CTT	CAT	TTT	360
106	G	L	N	T	V	I	R	E	I	V	C	G	L	H	F	120
361	ATG	TAT	GGT	GTT	ACA	GAA	GTG	ATT	GGT	GTG	GAT	TGC	GGG	TTT	CGC	405
121	M	Y	G	V	T	E	V	I	G	V	D	C	G	F	R	135
406	GGG	TTT	TAT	TCT	AAA	AAC	ACT	GTT	GCA	CTA	ACG	CCG	AAG	ACT	GTG	450
136	G	F	Y	S	K	N	T	V	A	L	T	P	K	T	V	150
451	AGT	GAC	ATC	CAC	AAG	CGC	GGG	GGA	ACC	ATA	CTA	GGA	ACC	TCC	CGA	495
151	S	D	I	H	K	R	G	G	T	I	L	G	T	S	R	165
496	GGG	GGA	CAT	GAT	ACA	TCA	AAG	ATT	GTC	GAC	AAC	ATA	CAA	GAT	CGT	540
166	G	G	H	D	T	S	K	I	V	D	N	I	Q	D	R	180
541	GAA	ATA	AAT	CAG	GTT	TAC	ATT	ATT	GGA	GGT	GAT	GGA	ACC	CAA	AAA	585
181	E	I	N	Q	V	Y	I	I	G	G	D	G	T	Q	K	195
586	GGA	GCA	AAT	GCA	ATA	TAT	AAG	GAA	ATT	AGG	CGC	CGT	GGA	CTT	AAA	630
196	G	A	N	A	I	Y	K	E	I	R	R	R	G	L	K	210
631	GTT	GCA	GTT	GCA	GGA	ATA	CCA	AAA	ACC	ATT	GAC	AAC	AAC	ATC	CCA	675
211	V	A	V	A	G	I	P	K	T	I	D	N	N	I	P	225
676	GTC	ATT	GAC	AAG	TCC	TTT	GGA	TTT	GAT	ACT	GCG	GTT	GAG	GAG	GCT	720
226	V	I	D	K	S	F	G	F	D	T	A	V	E	E	A	240
721	CAA	CGT	GCT	ATT	AAT	GCA	GCG	CAT	GTT	GAA	GCG	ACC	AGT	GTG	GAA	765
241	Q	R	A	I	N	A	A	H	V	E	A	T	S	V	E	255
766	AAC	GGC	ATT	GGA	ATT	GTC	AAG	CTA	ATG	GGT	CGG	TAC	AGT	GGG	TTC	810
256	N	G	I	G	I	V	K	L	M	G	R	Y	S	G	F	270
811	ATT	GCA	ATG	TAT	GCT	ACT	CTG	GCT	AGC	CGA	GAT	GTT	GAC	TGC	TGT	855
271	I	A	M	Y	A	T	L	A	S	R	D	V	D	C	C	285
856	CTG	ATT	CCC	GAG	TCA	CCC	TTT	TAC	CTT	GAA	GGC	AAA	GGA	GGG	CTC	900
286	L	I	P	E	S	P	F	Y	L	E	G	K	G	G	L	300
901	TAT	GAG	TTC	ATT	GCA	AAA	CGT	CTC	AGA	GAA	AAT	GGC	CAC	ATG	GTT	945
301	Y	E	F	I	A	K	R	L	R	E	N	G	H	M	V	315
946	ATA	GTG	ATT	GCT	GAA	GGA	GCA	GGA	CAG	GAT	CTT	GTT	GCA	GAG	AGC	990
316	I	V	I	A	E	G	A	G	Q	D	L	V	A	E	S	330
991	ATT	GAA	CAA	CAA	GAT	GCT	TCA	GGA	AAC	AAG	CTC	CTT	AAA	GAT	GTA	1035
331	I	E	Q	Q	D	A	S	G	N	K	L	L	K	D	V	345
1036	GGA	CTA	TGG	ATG	AGT	CTT	AAA	ATC	AAG	GAA	TAC	TTT	GCG	AAG	CAC	1080
346	G	L	W	M	S	L	K	I	K	E	Y	F	A	K	H	360

¹ große Buchstaben: fehlende Basen in der klonierten Sequenz, führen zum frühzeitigen Stop-Codon

1081 361	AAT N	GTA V	ATG M	GAC D	ATT I	ACT T	CTT L	AAA K	TAC Y	ATT I	GAT D	CCG P	ACA T	TAC Y	ATG M	1125 375
1126 376	ATC I	CGA R	GCT A	ATT I	CCA P	GCC A	AAT N	GCA A	TCT S	GAC D	AAC N	GTC V	TAC Y	TCA S	ACT T	1170 390
1171 391	CTC L	CTT L	GCC A	CAA Q	AGC S	GCA A	GTC V	CAT H	GGT G	GCA A	ATG M	GCT A	GGC G	TAT Y	ACC T	1215 405
1216 406	GGC G	TTT F	GTC V	TCT S	GGT G	CTT L	GTT V	AAT N	GGA G	AGG R	CAC H	ACC T	TAC Y	ATT I	CCC P	1260 420
1261 421	TTT F	AAC N	CGA R	ATA I	ACC T	GAA E	AGA R	CAG Q	AAC N	AAA K	GTT V	GTG V	ATT I	ACA T	GAT D	1305 435
1306 436	AGA R	ATG M	TGG W	GCG A	CGA R	ATG M	TTG L	TCA S	TCT S	ACA T	AAC N	CAG Q	CCC P	AGC S	TTC F	1350 450
1351 451	ATG M	AAC N	CCT P	CCT P	AAA K	GGA G	ACC T	ACG T	GAG E	TTT F	ACC T	GAC D	TAA *	1389		

PFK7

1	ATG	TCT	AGT	CCG	AGA	AGT	AAC	AAG	CCG	AAG	ATT	GTC	AAC	GGT	CCT	45
1	M	S	S	P	R	S	N	K	P	K	I	V	N	G	P	15
46	GGT	GGT	TAT	ATT	CTA	CAA	GAC	GTT	CCT	CAT	CTC	ATT	GAT	TAC	CTT	90
16	G	G	Y	I	L	Q	D	V	P	H	L	I	D	Y	L	30
91	CCT	GAT	CTT	CCT	ACT	TAT	CCA	AAT	CCA	TTG	CAA	GAC	AAT	CCA	GCT	135
31	P	D	L	P	T	Y	P	N	P	L	Q	D	N	P	A	45
136	TAC	TCA	GTG	GTT	AAG	CAA	TAC	TTT	GTT	CAT	GCT	GAT	GAT	AGT	GTC	180
46	Y	S	V	V	K	Q	Y	F	V	H	A	D	D	S	V	60
181	CCT	GAG	AAG	GTT	GTT	GTT	CAC	AAG	GAT	GGT	CCA	AGA	GGA	GTC	CAT	225
61	P	E	K	V	V	V	H	K	D	G	P	R	G	V	H	75
226	TTC	AGG	CGT	GCT	GGT	CCA	CGT	CAA	AAG	GTT	TAC	TTT	GAG	TCT	GAC	270
76	F	R	R	A	G	P	R	Q	K	V	Y	F	E	S	D	90
271	GAA	GTG	CAT	GCT	TGT	ATA	GTT	ACA	TGT	GGA	GGT	CTC	TGT	CCC	GGT	315
91	E	V	H	A	C	I	V	T	C	G	G	L	C	P	G	105
316	CTC	AAT	ACC	GTG	ATT	AGA	GAA	GTT	GTG	AGC	AGC	TTA	TCA	TAC	ATG	360
106	L	N	T	V	I	R	E	V	V	S	S	L	S	Y	M	120
361	TAT	GGA	GTA	AAG	AGA	ATT	CTT	GGA	ATC	GAT	GGT	GGA	TAC	AGA	GGA	405
121	Y	G	V	K	R	I	L	G	I	D	G	G	Y	R	G	135
406	TTT	TAC	GCC	AAG	AAT	ACT	ATC	CCC	TTA	AAC	TCT	AAA	GTC	GTG	AAT	450
136	F	Y	A	K	N	T	I	P	L	N	S	K	V	V	N	150
451	GAT	ATC	CAT	AAA	CGC	GGA	GGA	ACA	ATC	ATT	GGG	ACC	TCA	AGA	GGT	495
151	D	I	H	K	R	G	G	T	I	I	G	T	S	R	G	165
496	GGA	CAT	GAT	ACC	AAC	AAG	ATA	GTT	GAT	AGC	ATT	CAA	GAT	CGA	GGA	540
166	G	H	D	T	N	K	I	V	D	S	I	Q	D	R	G	180
541	ATC	AAT	CAG	GTT	TAC	ATT	ATT	GGA	GGA	GAT	GGA	ACC	CAG	CGA	GGT	585
181	I	N	Q	V	Y	I	I	G	G	D	G	T	Q	R	G	195
586	GCT	TCA	GTA	ATA	TTT	GAG	GAA	ATT	AGA	AGA	CGT	CGA	CTA	AAA	GTT	630
196	A	S	V	I	F	E	E	I	R	R	R	R	L	K	V	210
631	GCT	GTG	GTT	GGA	ATT	CCA	AAA	ACT	ATT	GAT	AAT	GAT	ATT	CCG	GTG	675
211	A	V	V	G	I	P	K	T	I	D	N	D	I	P	V	225
676	ATA	GAT	AAA	TCT	TTT	GGG	TTT	GAC	ACT	GCT	GTG	GAG	GAA	GCT	CAA	720
226	I	D	K	S	F	G	F	D	T	A	V	E	E	A	Q	240
721	CGA	GCG	ATT	AAC	GCA	GCA	CAT	GTT	GAA	GCC	GAG	AGT	AAT	GAG	AAT	765
241	R	A	I	N	A	A	H	V	E	A	E	S	N	E	N	255
766	GGT	ATC	GGT	TTT	GTC	AAG	CTT	ATG	GGT	CGT	TAC	AGC	GGG	TAC	ATA	810
256	G	I	G	F	V	K	L	M	G	R	Y	S	G	Y	I	270

B) Alignment der Phosphofructokinasen von Reis und *Arabidopsis*

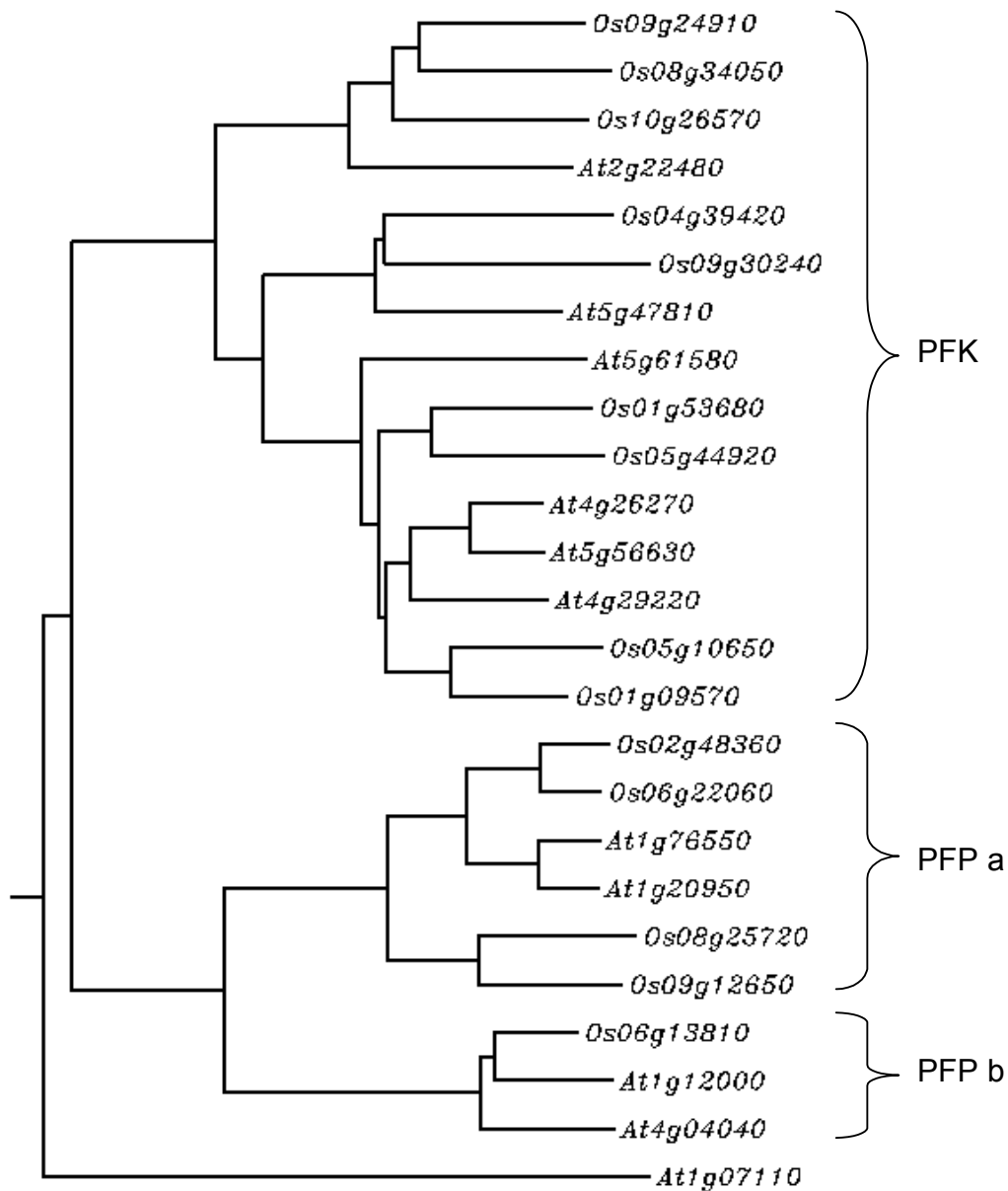
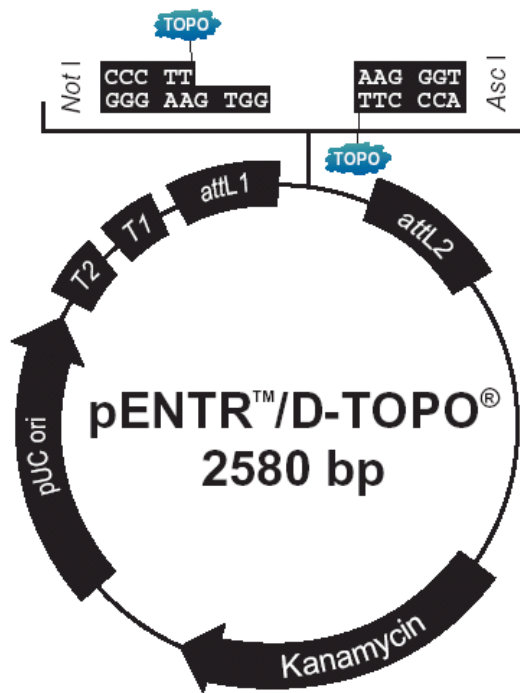
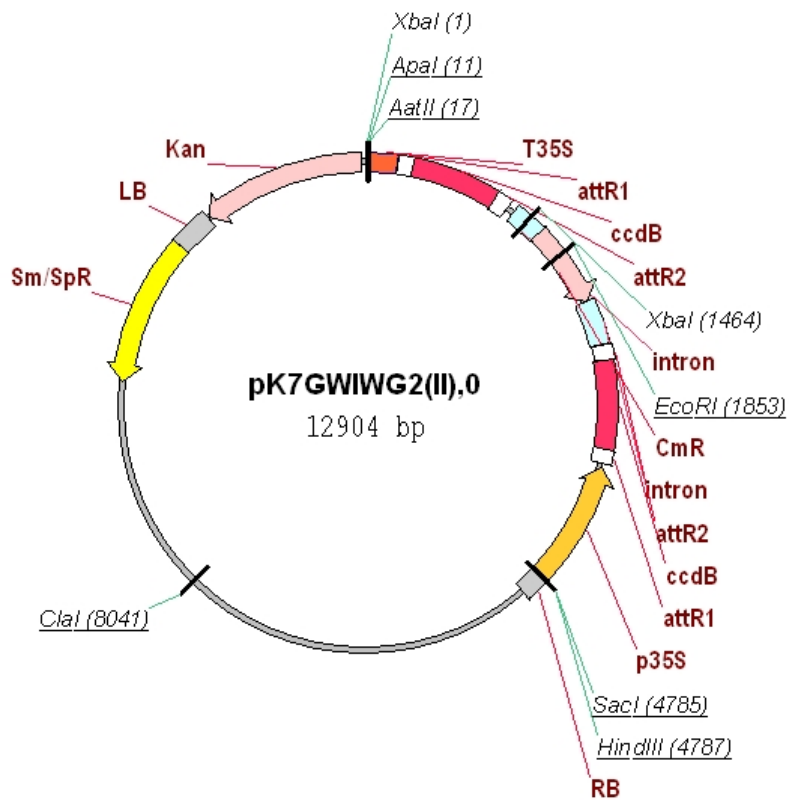


Abb. 1: Alignment der putativen Phosphofructokinase-Sequenzen aus *Arabidopsis* (At..., <http://www.arabidopsis.org/>) und Reis (Os..., <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1>). PFP a, α -Form der P_i-abhängigen Phosphofructokinase; PFP b, β -Form der P_i-abhängigen Phosphofructokinase; PFK, ATP-abhängige Phosphofructokinase.

C) Vektorkarten

Abb. 2: Karte des verwendeten Vektors pENTR/D-TOPO (www.invitrogen.com).Abb. 3: Karte des verwendeten RNAi-Vektors pK7GWIWG2(II) (www.plantgenetics.rug.ac.be/gateway).

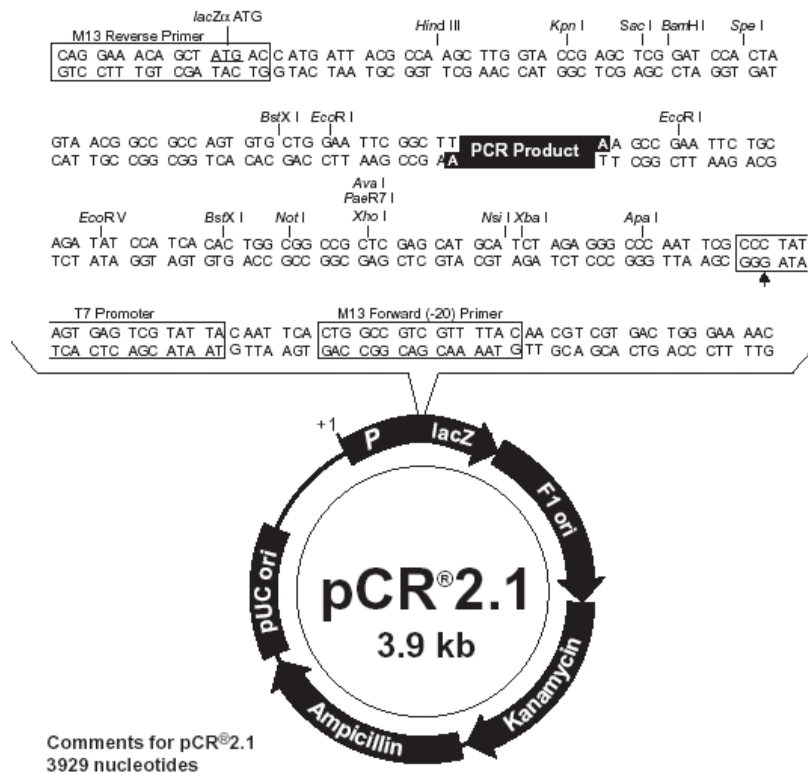


Abb. 4: Karte des verwendeten Vektors pCR 2.1 (www.invitrogen.com).

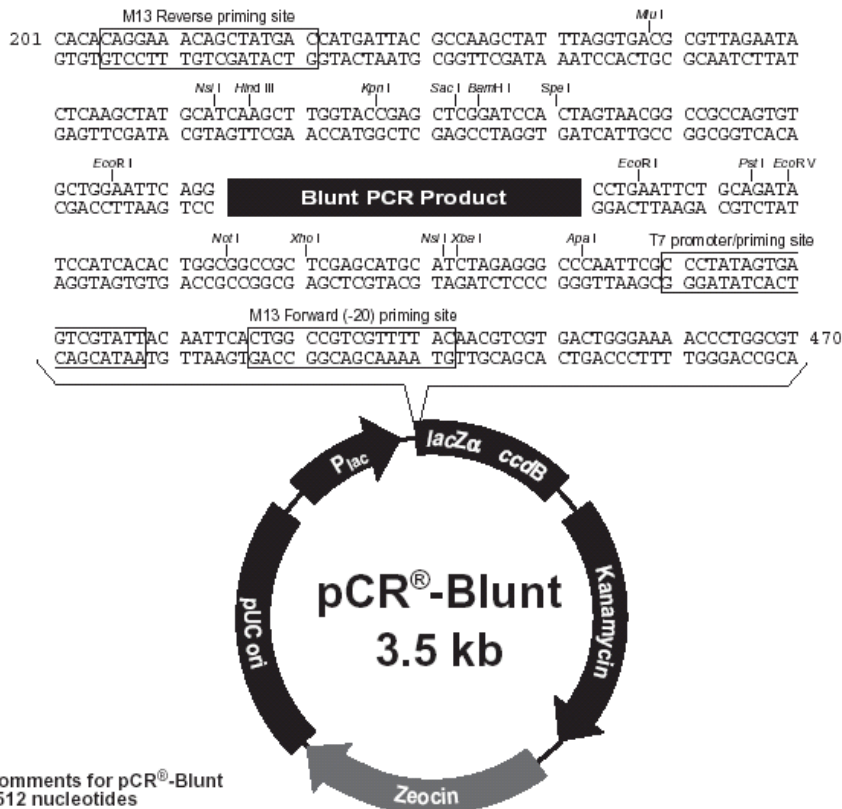


Abb. 5: Karte des verwendeten Vektors pCR Blunt (www.invitrogen.com).

Danksagung

An dieser Stelle danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm sehr herzlich für die jederzeit gewährte und vielfältige Unterstützung sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen. Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus und Herrn Prof. Dr. Rudolf Ehwald danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Sophia Biemelt, die viele gute Ideen zur Arbeit an der Thematik „Pyrophosphat“ eingebracht und mir viele Arbeits-Aufenthalte in Gatersleben ermöglicht hat. Ebenfalls entstand in Diskussionen mit ihr die Idee zur Aufklärung der Sequenz der PFK, und sie entwickelte die Strategien zur Klonierung. Auch danke ich ihr sehr für kritische Anmerkungen zu Manuskripten und der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Gerd Albrecht danke ich für die Einführung in die Thematik „Sauerstoffmangel“ schon während meines Hauptstudiums, den Freiraum zum Experimentieren und für die frühe Möglichkeit, an Tagungen teilzunehmen. Er hat ebenfalls gute Ideen, insbesondere zum Pyrophosphat, beigesteuert.

Die gesamte Arbeitsgruppe Molekulare Pflanzenphysiologie am IPK Gatersleben hat wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht. Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Sonnewald möchte ich mich für die Überlassung der UPPa-II-2-Kartoffel-Pflanzen sowie die Finanzierung der Experimente in Gatersleben bedanken. Herr Dr. Mohammad Hajirezaei hat mich in die Extraktion und Messung der Metabolit-Gehalte eingeführt, und führte die Bestimmung der Fru2,6BP-Gehalte mittels IC-MS durch. Melanie Ruff danke ich für die freundliche Aufnahme in ihr Labor, viele Hilfestellungen und Ratschläge. Ein großes Dankeschön geht an Christiane Börnke und Heike Deppner für die Übernahme vieler Klonierungsarbeiten, insbesondere für die PFKs. Andrea Knospe danke ich für die Transformation der Fru2,6BP-Pflanzen, und hilfreiche Ratschläge für die Gewebekultur. Anette Maier danke ich für *Arabidopsis*-Pflanzen. Allen anderen, die hier nicht namentlich aufgeführt wurden, sei auch gedankt.

In der Arbeitsgruppe „Molecular and Laser Physics“ an der Universität Nijmegen konnte ich Messungen mit dem photoakustischen Lasersystem durchführen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Frans Harren als Projektleiter. Besonderer Dank gilt Dr. Elena Iulia Boamfa und Dr. Luc-Jan Laarhoven für die freundliche Aufnahme, die Hilfe bei den Messungen und neue Anregungen

aus der Sicht der Physiker. Ine Meyer danke ich für die Organisation meiner Aufenthalte dort, und der EU („European Union Access to Research Infrastructures action of the Improving Human Potential Programme“) für die großzügige Finanzierung.

Besonders herzlich danke ich Dr. Yvonne Pörs für die Einführung in die Geheimnisse der Photosynthese-Messung sowie die ATP-Messung mittels Luminometer. Sie hat mich auf neue Ideen für Versuche gebracht, und vor allem die CO₂-Gaswechsellmessungen zum großen Teil selbst durchgeführt. Ich danke ihr außerdem für kritisches Lesen des Manuskriptes.

Ein Dankeschön geht an Dr. Peter Geigenberger am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für die Überlassung der PFP-RNAi-Pflanzen, sowie an ihn und Dr. Joost van Dongen für hilfreiche Diskussionen.

Der gesamten AG Pflanzenphysiologie danke ich für die freundliche Aufnahme, Unterstützung bei Problemen des Laboralltags, erholsame Mittagspausen in der Mensa und angenehme Stunden außerhalb des Labors. Frau PD Dr. Christina Kühn danke ich für viele interessante Diskussionen und das kritische Lesen dieser Arbeit. Ein Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Paul Hoffmann und Frau PD Dr. Barabara Rank für wertvolle Hinweise zur Thematik Photosynthese. Olaf Czarnecki danke ich für Hilfe bei Computer-Fragen, und Frauke Weiß für die organisatorischen Aufgaben. Den technischen Assistentinnen Kersten Träder, Alexandra Hackel, Barbara Hickel, Renate Kräft und Erika Helmer sei herzlich gedankt für ihre Hilfe. Undine, Isabella, Olaf, Andrea, Dieter, Enrico, Boris und Uli möchte ich für ein offenes Ohr, insbesondere bei Problemen der Molekularbiologie, danken.

Dem Cusanuswerk danke ich für die großzügige Finanzierung meiner Arbeiten durch ein Stipendium, für neue Denkanstöße auf den Graduiertentagungen und die Teil-Finanzierung meiner Beteiligung an der „Plant Anaerobiosis“-Tagung in Perth/ Australien. Dem „Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ sei gedankt für dreimonatige Finanzierung meiner Promotion sowie finanzielle Unterstützung einiger Reisen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung in jeder Hinsicht danken, und allen meinen Freunden und Verwandten für Ablenkungen vom Laboralltag.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderweitig nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Berlin, 18. 07.2005

Angelika Mustroph

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angelika Mustroph
Geburtsdatum: 31. Mai 1977
Geburtsort: Dessau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

09/1984 – 07/1991 20. Polytechnische Oberschule Dessau
09/1991 – 07/1996 Europa-Gymnasium Dessau (Abitur, Abschlussnote 1.0)
10/1996 – 09/2001 Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin, Abschlussnote 1.0
12/2000 – 09/2001 Diplomarbeit mit dem Thema „Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel der unterschiedlich staunässetoleranten Getreidearten *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L. und *Zea mays* L. unter Sauerstoffmangel“, Betreuer Prof. Ernst-Manfred Wiedenroth, AG Botanik & Biologiedidaktik, Note 1.0
Seit 10/2001 Promotionsstudentin im Fach Biologie/ Pflanzenphysiologie an der HU Berlin, Betreuer Prof. Grimm/ AG Pflanzenphysiologie
03/2002 – 05/2002 Promotionsstipendium der „Frauenförderung“
06/2002 – 05/2005 Promotionsstipendium des Cusanuswerkes

Praktika und Tutorien

17.08. – 11.09.1998 Praktikum am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle
10/1998 – 03/2000 Studentische Hilfskraft in der AG Botanik/ Biologiedidaktik, HU Berlin, Dr. Gerd Albrecht
28.06. – 02.07.1999 Kurs „Stereology in Plant Anatomy“, Charles University, Prag
02.08. – 24.09.1999 Werkstudentin bei der Bayer AG, Geschäftsbereich Pflanzenschutz, Ressort Forschung
06/2000 – 12/2000 Studentische Hilfskraft in der AG Angewandte Botanik, HU Berlin, PD Dr. Kurt Zoglauer
2002/ 2003 Forschungsaufenthalte in Nijmegen/ Holland (AG Frans Harren)

Verzeichnis der Veröffentlichungen

Publikationen

- 2003 - Mustroph A, Albrecht G: Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: Fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. *Physiologia Plantarum*, 117: 508-520
- 2003 - Albrecht G, Mustroph A: Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. *Planta*, 217: 252–260
- 2003 - Albrecht G, Mustroph A: Sucrose utilization via invertase and sucrose synthase with respect to increasing contents of cellulose and callose in wheat roots under oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50: 813–820
- 2004 - Albrecht G, Mustroph A, Fox T: Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum*, 120: 93-105
- 2005 - Mustroph A, Albrecht G, Hajirezaei M, Grimm B, Biemelt S: Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Annals of Botany*, 96: 717-726
- 2005 - Mustroph A, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Albrecht G, Grimm B: Organ specific analysis of the anaerobic primary metabolism in anaerobic rice and wheat seedlings I. Dark ethanol production is dominated by the shoots. *Eingereicht bei Planta*
- 2005 - Mustroph A, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Harren FJM, Poers Y, Grimm B: Organ specific analysis of the anaerobic primary metabolism in anaerobic rice and wheat seedlings II. Light exposure reduces needs for fermentation and extends survival during anaerobiosis. *Eingereicht bei Planta*

Vorträge

(der Name des Vortragenden ist fett gedruckt)

- 2000 - **Mustroph A**, Albrecht G, Wiedenroth E-M: Die Rolle von Glycolyse und Fermentation unter Sauerstoffmangel bei unterschiedlich staunässetoleranten Getreidearten, XI. Berliner Graduierten-Kolloquium „Havel-Spree-Kolloquium“
- 2001 - **Albrecht G**, Mustroph A, Fox T, Drew MC: Anoxia but not hypoxia results in accelerated carbohydrate utilization via glycolysis in roots of intact wheat plants. 7th

- conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Nijmegen, Niederlande
- 2002 - **Mustroph A**, Albrecht G, Biemelt S, Grimm B: Spielt Pyrophosphat eine Rolle bei der Glycolyse unter Sauerstoffmangel? 1. Studententag der Lebenswissenschaften in Berlin/Mitte am 19. Juli 2002
- 2002 - **Mustroph A**, Albrecht G, Biemelt S, Grimm B: The role of pyrophosphate for plant primary metabolism under oxygen deficiency stress. XIII. Berliner Graduierten-Kolloquium „Havel-Spree-Kolloquium“, 07. 12 .2002
- 2003 - **Albrecht G**, Mustroph A, Volodymyr Radchuk, Nese Sreenivasulu, Winfriede Weschke: Microarray analysis of gene expression during hypoxia and anoxia in roots of barley. 2nd Symposium “Signals sensing and plant primary metabolism”, Potsdam, April 2003
- 2003 - **Mustroph A**, Grimm B: Reaktionen von Pflanzen auf Sauerstoffmangel. 20. Wallenfesler Rundgespräch zur Pflanzenbiochemie, Wallenfels, Mai 2003
- 2003 - **Mustroph A**: Fermentation in wheat and rice plants under anoxia. XIV. Berliner Graduierten-Kolloquium „Havel-Spree-Kolloquium“, 09. 10 .2003
- 2004 - **Mustroph A**, Poers Y, Grimm B, Boamfa EI, Laarhoven L-J, Harren FJM, Albrecht G: The influence of light on plant survival and ethanolic fermentation during anaerobiosis in rice and wheat seedlings. 8th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Perth, Australien, September 2004
- 2005 - **Mustroph A**, Biemelt S, Dongen J van, Fröhlich A, Geigenberger P, Grimm B: Die Rolle der Pyrophosphat-abhängigen Phosphofructokinase in Kartoffeln unter Sauerstoffmangel-Stress. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, März 2005

Posterbeiträge

- 2000 - Mustroph A, Biemelt S, Albrecht G. High activity of fermentative enzymes as a sign for flooding-intolerance. Deutsche Botanikertagung, Jena, September 2000
- 2000 - Albrecht G, Klotke J, Mustroph A, Biemelt S. Sucrose synthase- a key point in sucrose metabolism of wheat roots in oxygen deficiency stress. 1st Symposium “Signals sensing and plant primary metabolism”, Potsdam, Oktober 2000
- 2001 - Albrecht G, Mustroph A, Biemelt S: Increasing sucrose synthase activity correlates with the content of cellulose in wheat roots suffering from oxygen shortage. 7th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Nijmegen,

Niederlande, Juni 2001

- 2001 - Mustroph A, Albrecht G: High activity of fermentative enzymes as a sign for flooding intolerance!?, 7th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Nijmegen, Niederlande, Juni 2001
- 2002 - Mustroph A Albrecht G: High activity of fermentative enzymes as a sign for flooding intolerance. 1. Studententag der Lebenswissenschaften in Berlin/Mitte am 19. Juli 2002
- 2002 - Mustroph A, Albrecht G: Influence of hypoxic pre-treatment for survival of wheat plants under anoxia. Botanikertagung Freiburg, September 2002
- 2002 - Mustroph A, Albrecht G, Biemelt S, Grimm B: Significance of pyrophosphate for the primary metabolism under hypoxia. Botanikertagung Freiburg, September 2002
- 2002 - Mustroph A, Radchuk V, Sreenivasulu N, Albrecht G: Gene expression in barley under oxygen deficiency stress. Botanikertagung Freiburg, September 2002
- 2003 - Mustroph A, Albrecht G, Biemelt S, Grimm B: Significance of pyrophosphate for the primary metabolism under hypoxia. 2nd Symposium "Signals sensing and plant primary metabolism", Potsdam, April 2003
- 2003 - Mustroph A, Albrecht G: Influence of hypoxic pre-treatment for survival of wheat plants under anoxia. 2nd Symposium "Signals sensing and plant primary metabolism", Potsdam, April 2003
- 2004 - Mustroph A, Biemelt S, Albrecht G, Grimm B: Der Einfluß von Pyrophosphat auf die Glycolyse unter Hypoxie. 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, März 2004
- 2004 - Mustroph A, Albrecht G: Reaktionen unterschiedlich staunässe-toleranter Getreidepflanzen auf Sauerstoffmangel. 9. Jahrestagung des Arbeitskreises „Experimentelle Ökologie“ der GfÖ in Potsdam, April 2004
- 2004 - Mustroph A, Poers Y, Grimm B, Boamfa EI, Laarhoven L-J, Harren FJM, Albrecht G: The influence of light on plant survival and ethanolic fermentation during anaerobiosis in rice and wheat seedlings. Botanikertagung Braunschweig, September 2004
- 2004 - Mustroph A, Grimm B, Biemelt S, Sonnewald U, Albrecht G: Has pyrophosphate an important function in plant metabolism during hypoxia? Botanikertagung Braunschweig, September 2004 und 8th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis, Perth, Australien, September 2004